

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2005年8月4日 (04.08.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/070964 A1(51)国際特許分類⁷: C07K 16/18, G01N 33/53, C12N 5/06, A61K 35/14, 35/28, 35/44, A61P 31/00, 35/00, 37/04

I I 3 O 4 号室 Nagano (JP). 矢原一郎 (YAHARA, Ichiro) [JP/JP]; 〒2220012 神奈川県横浜市港北区富士塚 1-5-22 Kanagawa (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/000923

(74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市鉾町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22)国際出願日: 2005年1月25日 (25.01.2005)

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語
(26)国際公開の言語: 日本語
(30)優先権データ: 特願2004-018747 2004年1月27日 (27.01.2004) JP

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社医学生物学研究所 (MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F Aichi (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 中川とも子 (NAKAGAWA, Tomoko) [JP/JP]; 〒3994511 長野県上伊那郡南箕輪村 8019-1 ヴェルートラルデュ 3-3 O 5 Nagano (JP). 樽井俊介 (KUREI, Syunsuke) [JP/JP]; 〒3960011 長野県伊那市伊那部 5379 Nagano (JP). 田路真悟 (TOJI, Shingo) [JP/JP]; 〒3960621 長野県伊那市富県 5861-3 Nagano (JP). 岡部あや子 (OKABE, Ayako) [JP/JP]; 〒3960215 長野県上伊那郡高遠町小原 407-3 Nagano (JP). 久原基樹 (KUHARA, Motoki) [JP/JP]; 〒3960011 長野県伊那市伊那部 7105 堀米ハイツいー2 Nagano (JP). 岸義朗 (KISHI, Yoshiro) [JP/JP]; 〒3994501 長野県伊那市西箕輪 3813-1 スペースアーカヒル

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54)Title: METHOD OF ISOLATING MONOCYTES

(54)発明の名称: 単球の単離方法

(57)Abstract: HIDE1 is provided a novel monocyte marker. Since HIDE1 is a membrane protein, monocytes can be specifically detected by using an antibody capable of binding to HIDE1. It is also possible to collect HIDE1-positive monocytes from peripheral blood or the like with the use of a cell sorter, a magnet, etc. The thus obtained monocytes are useful in cellular immunotherapy.

WO 2005/070964 A1

(57)要約: 本発明によって、新たな単球マーカーとしてHIDE1が提供された。HIDE1は膜蛋白質であることから、HIDE1に結合する抗体を使用することにより単球を特異的に検出することができる。また、セルソーターまたはマグネット等を利用して、末梢血等からHIDE1陽性単球を回収することもできる。本発明に基づいて得ることができる単球は、細胞免疫療法に有用である。

明 細 書

単球の単離方法

技術分野

[0001] 本発明は、単球マーカー検出用抗体、及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 単球は、血液中を遊走する貧食能を持った単核食細胞系に属する細胞である。一旦分化すると、骨髄中に短期間のみ存在し、その後、循環系に入りそこに数日間存在する。その後、単球は組織及び体腔に浸潤し、マクロファージ及び樹状細胞へと分化する。炎症性疾患、移植後の拒絶反応、感染症の回復期、単球性白血病等において、循環系中の単球が増加することが知られている。

[0003] 免疫療法は、免疫細胞、サイトカイン及び抗体等を活性化する物質により、患者の免疫機能を強化することを目的とする治療法である。免疫療法は他治療の効果の向上、また再発予防等を目的とした補助療法として注目されている。代表的な免疫療法として、細胞免疫療法が挙げられる。細胞免疫療法では、一般に、患者より取り出した免疫細胞を *in vitro* において増殖・活性化してから患者に戻すという工程が取られる。細胞免疫療法に用いられる細胞としては、リンパ球及び樹状細胞を挙げることができる。

[0004] 腫瘍に対するリンパ球を利用した免疫療法の一つとして、サイトカインなどで活性化又は増殖させた末梢血リンパ球、腫瘍組織浸潤リンパ球等を使用した方法は公知である(活性化リンパ球(LAK)療法; *J. Immunol.* (1984) 132: 2123-8; *J. Exp. Med.* (1982) 155: 1823-41)。LAK療法では、例えば、患者の血液中のリンパ球を取り出し、この抗原刺激を加えていない末梢血リンパ球にインターロイキン2(IL-2)のようなサイトカインを加えることによって高い抗腫瘍活性を有するリンホカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)を得て、患者へ戻す方法が取られる。

[0005] 樹状細胞(dendritic cell; DC)についての研究は、1990年代に入ってから飛躍的に進歩している。DCは、強力な抗原提示細胞であることが知られており、抗原を与えて、Tリンパ球を活性化させる効率が最も良い細胞であるため免疫細胞療法における利

用が提案されている。樹状細胞を利用した免疫細胞療法では、例えば、腫瘍細胞の抗原(癌特異的抗原)をex vivoにおいて患者自身の樹状細胞に取り込ませて、癌抗原提示能力を増強した後に患者に戻し、患者の癌に対する免疫反応を誘起する。生体外において抗原を取り込んだ樹状細胞は患者に投与された場合、生体内においてヘルパーT細胞を誘導し、そのヘルパーT細胞により、キラーT細胞及びナチュラルキラー細胞が活性化されることにより患者の癌を排除する力が高まるものと考えられる。

[0006] このような樹状細胞を利用した免疫細胞療法は、メラノーマに対して最初に臨床応用された。また、生体内に外来抗原が侵入した場合に起こる免疫反応では、外来抗原を貧食した樹状細胞がリンパ節に移動し、リンパ球に対して抗原を提示することから、腫瘍等の病巣内に直接樹状細胞を注入する治療法も行われている(樹状細胞腫瘍内局注療法(DCI))。さらに、樹状細胞と活性化リンパ球とを混合し、両細胞を活性化して患者に投与する方法(DCAT療法)も実用化されている。

[0007] その他の血液系細胞を用いた治療方法として、マクロファージによる脊髄損傷の治療が挙げられる。脊髄を切断されたラットの損傷部位へのマクロファージの直接投与により、軸索の再成長が誘導されることが報告されている。そこでヒトにおいても、脊髄損傷による麻痺を治療することを目的として、活性化自己マクロファージを脊髄の実質組織に注入する方法が臨床的に検討されている。

[0008] 分泌及び膜型蛋白質の多くが受容体としての機能を有し、リガンドとの結合により、様々な細胞応答を惹起する細胞シグナルを伝達することが知られている。一般的に、このような細胞応答に関与するリガンドの多くは薬学的にも重要である。そこで、リガンド及び受容体の同定を目的として多くの研究が行われている。特許文献1及び2も、このような受容体の同定を目的とするものであり、混合リンパ球反応ライブラリー中のクローニングからヒトTANGO353と命名された膜貫通型蛋白質をコードするcDNAの取得について記載している。特許文献1及び2では、その由来のみに基づき、TANGO353がT細胞若しくはB細胞の増殖・分化・活性化、またはこれらの細胞の機能異常と関係する症状の緩和等に使用し得ると記載している。しかしながら、特許文献1及び2では、該蛋白質のより詳細な発現分布、実際の機能等については検討し

ておらず、TANGO353の単球との関連はこれらの文献の記載からは不明である。

[0009] 現在、膨大なゲノム配列情報が提供されており、遺伝子発現プロファイリングは、それら配列が明らかにされた遺伝子が関わる生物学的事象を明らかにしていく上で多いに役立つものと考えられている。HiCEP (high coverage expression profiling) 技術は、增幅断片長多型 (AFLP; Vos et al., Nucleic Acids Res. (1995) 23: 4407-17) に基づいて開発された方法である。HiCEP技術を用いた発現プロファイリングでは、配列情報は不要であり、非コード転写物、既知及び未知の遺伝子を検出することができる。

[0010] 特許文献1:米国特許公開US2002/0055139号

特許文献2:国際公開01/09162号パンフレット

非特許文献1:Fukumura et al., Nucleic Acids Res. (2003) 31: e94

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] 細胞免疫治療等において使用される樹状細胞及びマクロファージは、単球から分化誘導させることができることから、臨床的には、患者自身の末梢血単球を分離して、利用する方法が広く用いられている。末梢血単球を利用する方法では、最初にアフェレエーシスまたは比重遠心法により単球を分離している。このような物理的方法では、何度も遠心操作を繰り返す必要があり、細胞へのダメージが大きく、さらに細胞が細菌に汚染される機会が増えるという問題がある。また、CD14、CD11b及びCD33を含むいくつかの表面抗原が単球のマーカーとして公知であるが、より特異的な単球マーカーが求められている。そこで、本発明は、単球において高発現されている、マーカーとなり得る蛋白質を同定することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] そこで、マウス脾臓の未成熟樹状細胞から約60,000遺伝子のmRNA、及び成熟樹状細胞から約57,000遺伝子のmRNAを回収し、HiCEP技術を用いて各遺伝子の発現量の差を計測した(非特許文献1)。その結果、未成熟樹状細胞において高発現を示した1回膜貫通型蛋白質遺伝子 High expression Gene of Immature Dendritic cells 1(HIDE1)を同定した(配列番号:1、該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を配列

番号:2に示す)。また、PCR法で全長遺伝子をクローニングした際、膜貫通領域を含まないスプライスバリエントが回収されてきており、分泌型のHIDE1の存在が推測される(soluble HIDE1; sHIDE1)(塩基配列:配列番号:3; アミノ酸配列:配列番号:4)。図1に膜型HIDE1と分泌型HIDE1とのアミノ酸配列の比較を示す。

[0013] マウス未成熟樹状細胞における高発現を示したHIDE1について、ヒト相同分子が他の研究者により既にデータベース上に公開されていた(XM_172995)。ヒトHIDE1の塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を、配列番号:5及び配列番号:6(図2及び図3)にそれぞれ示した。マウスHIDE1とヒトHIDE1の、塩基配列とアミノ酸配列の相同性は、それぞれ73.9%、および68.4%であった。

本発明において新たな単球マーカーであることが示されたヒトHIDE1は、特許文献1及び2に記載されるTANGO353と配列が100%一致していた。しかしながら、特許文献1及び2には、TANGO353をT及びBリンパ球を含む混合物よりクローニングしたことが記載され、その由来に基づきTANGO353がT及びBリンパ球の分化・増殖に関与している可能性について示唆されているのみである。即ち、TANGO353が単球に発現していること、及び単球マーカーとして使用できることについては記載も示唆もされていない。

[0014] ヒトHIDE1遺伝子を胎盤cDNAライブラリーよりクローニングし、その遺伝子産物をマウスに免疫し、FCMとWBおよび免疫沈降に使用可能なモノクローナル抗体(抗HIDE1抗体)を作製した(図4)。続いて、ヒト末梢血単核球(PBMC)を材料として、抗HIDE1抗体により染色した結果、HIDE1は主に単球に発現しており、リンパ球には発現していないことが分かった。顆粒球にも若干の発現が認められたが、単球の染色に比べてあきらかに弱かった(図5)。さらに、他の単球マーカー(CD14、CD11b及びCD33)について、抗HIDE1抗体との二重染色を行った。その結果、抗HIDE1抗体によってCD14よりも広く単球を染色、及びHIDE1をマーカーとすればCD11bを利用する場合よりも単球を特異的に染色できることが判明した。

[0015] さらに、HIDE1は、HL60、U937及びTHP-1等の単球系のヒト培養細胞においても発現が認められ、培養細胞系を含む単球マーカーとしてHIDE1を使用できることが示された。単球系培養細胞のTHP-1を分化誘導因子であるホルボールエステルによっ

てマクロファージ様細胞に分化させると、HIDE1の発現は著しく減少した(図7d)。この結果はHIDE1が単球に特異的に発現していることを強く示唆しており、HIDE1が単球マーカーとして利用できることを強調している。

[0016] 以上のように、本発明によりHIDE1を特異的な単球マーカーとして使用できることが示された。生体内において骨髓幹細胞から発生・分化した単球は、血液中から組織内へと移入し、より活性化した機能を有する樹状細胞(DC)及びマクロファージに分化することが知られている。そこで、本発明の単球マーカーHIDE1を指標として細胞をスクリーニングすることにより単球を検出・単離することができるだけでなく、単離された単球をin vitroにおいて、公知の手法により分化させることによりDC及びマクロファージを取得することができる。また、HIDE1はリンパ球には発現していないことから、抗HIDE1抗体を用いて末梢血からHIDE1陽性細胞を除き、リンパ球を濃縮するためのツールとしても利用できる。よって本発明は、以下の抗体ならびにその用途を提供するものである。

[1]以下の(1)～(3)から選択される蛋白質、またはポリペプチドに結合する単球マーカー検出用抗体。

(1)HIDE1蛋白質、

(2)HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質、及び

(3)上記(1)または(2)の蛋白質の断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片

[2]次の工程を含む、単球の検出方法。

(1)[1]記載の抗体と、単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び

(2)工程(1)において、抗体と結合した血液細胞を検出する工程

[3]次の工程を含む、単球の単離方法。

(1)[1]記載の抗体と、単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び

(2)工程(1)において、抗体と結合した血液細胞を回収する工程

[4] 血液細胞試料が末梢血液、臍帯血または骨髄である、[2]または[3]記載の方法。

[5] [1]記載の抗体を含む、単球を検出及び／または単離するためのキット。

[6] 次の工程を含む、イン・ビトロにおいて単球より樹状細胞を誘導する方法。

(1) 単球細胞を樹状細胞分化誘導因子存在下で培養する工程、及び、

(2) 工程(1)で培養された細胞を[1]記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞から樹状細胞への分化が誘導されたと判定する工程

[7] 樹状細胞分化誘導因子がGM-CSF及びIL-4である、[6]記載の方法。

[8] 次の工程を含む、イン・ビトロにおいて単球よりマクロファージを誘導する方法。

(1) 単球細胞をマクロファージ分化誘導因子存在下で培養する工程、及び、

(2) 工程(1)で培養された細胞を[1]記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞からマクロファージ様細胞への分化が誘導されたと判定する工程

[9] マクロファージ分化誘導因子がホルボールエステルである、[8]記載の方法。

[10] 次の工程を含む、樹状細胞を取得する方法。

(1) 採取された血液細胞試料を[1]記載の抗体と接触させる工程、

(2) 工程(1)において抗体と結合した血液細胞を回収する工程、

(3) 工程(2)において回収された血液細胞を樹状細胞分化誘導因子存在下で培養する工程、

(4) 工程(3)で培養された細胞を[1]記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞が樹状細胞に分化したと判定する工程、及び

(5) 工程(4)において分化したと判定された細胞を樹状細胞として単離する工程

[11] 単離された樹状細胞に抗原を取り込ませる工程をさらに含む、[10]記載の方法。

[12] 単離された樹状細胞が、腫瘍の予防及び／または治療に用いられるものである、[10]記載の方法。

[13] 単離された樹状細胞に腫瘍特異的抗原を取り込ませる工程をさらに含む、[12]記載の方法。

[14] 単離された樹状細胞が、自己免疫疾患の予防及び／若しくは治療、または臓器移植における拒絶反応の緩和に用いられるものである、[10]記載の方法。

[15] 次の工程を含む、マクロファージを取得する方法。

(1) 採取された血液細胞試料を[1]記載の抗体と接触させる工程、

(2) 工程(1)において抗体と結合した血液細胞を回収する工程、

(3) 工程(2)において回収された血液細胞をマクロファージ分化誘導因子存在下で培養する工程、

(4) 工程(3)で培養された細胞を[1]記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞がマクロファージ様細胞に分化したと判定する工程、及び

(5) 工程(4)において分化したと判定された細胞をマクロファージとして単離する工程

[16] 単離した細胞をさらに活性化する工程を含む、[15]記載の方法。

[17] 単離されたマクロファージが、脊髄損傷の治療、腫瘍、感染性疾患、自己免疫疾患または免疫不全疾患の治療及び／または予防に用いられるものである、[15]または[16]記載の方法。

[18] 次の工程を含むリンパ球の回収方法。

(1) [1]記載の抗体と、リンパ球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び、

(2) 工程(1)において、抗体に結合されなかった血液細胞を回収する工程

[19] 次の工程を含む活性化リンパ球を取得する方法。

(1) [1]記載の抗体と、リンパ球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、

(2) 該抗体に結合されなかった血液細胞をリンパ球として回収する工程、及び

(3) 工程(2)において回収されたリンパ球を培養する工程、および

(4) 工程(3)において培養されたリンパ球を活性化し、活性化リンパ球を回収する工程

[20] 血液細胞試料が末梢血液、臍帯血または骨髓である、[18]または[19]記載の方法。

[21] 活性化リンパ球が、腫瘍または感染性疾患の予防及び／または治療に用いられるものである、[19]記載の方法。

[0017] 本発明の抗体を利用して単球、樹状細胞、マクロファージ及びリンパ球が得られることから、本発明はさらにこれらの細胞を利用した治療及び／予防方法を提供する。具体的には、患者の末梢血、臍帯血または骨髓等の血液細胞試料を本発明の抗体と接触させ、該抗体に結合した単球を単離し、適当なサイトカインで処理して得られる樹状細胞を必要に応じ活性化し、患者に投与することにより腫瘍の治療及び／または予防のための医薬組成物の製造における使用に関する。

[0018] あるいは本発明は、以下の(1)～(3)から選択される蛋白質、またはポリペプチドに結合する抗体またはその可変領域を含む断片の、単球マーカー検出用抗体としての使用に関する。加えて本発明は、以下の(1)～(3)から選択される蛋白質、またはポリペプチドに結合する抗体またはその可変領域を含む断片の、単球細胞を検出および単離のいずれかまたは両方のためのキットの製造における使用に関する。

(1) HIDE1蛋白質、

(2) HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質、及び

(3) 上記(1)または(2)の蛋白質の断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片

加えて本発明は、上記抗体を使用して単離された樹状細胞を投与する工程を含む、腫瘍の予防及び／または治療方法を提供する。あるいは本発明は、上記抗体を使用して単離された樹状細胞の、腫瘍の予防及び／または治療のための医薬組成異物の製造における使用に関する。

更に本発明は、上記抗体を使用して単離された樹状細胞を投与する工程を含む、自己免疫疾患の予防及び／若しくは治療、または臓器移植における拒絶反応の緩和のための方法を提供する。あるいは本発明は、上記抗体を使用して単離された樹状細胞の、自己免疫疾患の予防及び／若しくは治療するための医薬組成物、または

臓器移植における拒絶反応の緩和するための医薬組成物の製造における使用に関する。

また本発明は、上記抗体を使用して単離されたマクロファージを投与する工程を含む、脊髄損傷の治療、腫瘍、感染性疾患、自己免疫疾患または免疫不全疾患の治療及び／または予防のための方法を提供する。あるいは本発明は、上記抗体を使用して単離されたマクロファージの、脊髄損傷の治療、腫瘍、感染性疾患、自己免疫疾患または免疫不全疾患の治療及び／または予防のための医薬組成物の製造における使用に関する。

ならびに本発明は、上記抗体を使用して単離された活性化リンパ球を投与する工程を含む、腫瘍または感染性疾患の予防及び／または治療のための方法を提供する。あるいは本発明は、上記抗体を使用して単離された活性化リンパ球の、腫瘍または感染性疾患の予防及び／または治療のための医薬組成物の製造における使用に関する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]マウスHIDE1 (mHIDE1、配列番号:2) 及びマウス分泌型HIDE1 (sHIDE1、配列番号:4) のアミノ酸配列を比較した図である。86.5%の配列相同性が認められた。

sHIDE1では、mHIDE1に含まれる膜貫通領域が欠失している。

[図2]マウスHIDE1 (mHIDE1、配列番号:1) 及びヒトHIDE1 (hHIDE1、配列番号:5) のmRNA配列を比較した図である。73.9%の配列相同性が認められた。

[図3]マウスHIDE1 (mHIDE1、配列番号:2) 及びヒトHIDE1 (hHIDE1、配列番号:6) のアミノ酸配列を比較した図である。68.4%の配列相同性が認められた。

[図4]抗HIDE1抗体の取得を確認した結果を示す図である。(a)は、hHIDE1一過性発現293T及び野生型293Tを用いてフローサイトメトリ(FCM)を行った結果を示す。実線がhHIDE1一過性発現293T、破線が野生型293Tに対する抗HIDE1抗体(1H12)の反応を示す。(b)は、hHIDE1発現293T(H)及び他のMyc-tag融合蛋白質を発現した293T(C)に対する抗HIDE1抗体(3F12)を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。ポジティブコントロールに抗Myc-tag抗体(MBL)を用いた。ポジティブコントロールのバンドの位置を矢印で示す。(c)は、hHIDE1発現293T(H)と他の蛋白質を発現した

293T(C)に対する抗HIDE1抗体(3H3)を用いた免疫沈降の結果を示す。

[図5]抗HIDE1抗体(1H12)を用いた末梢血単核球画分(PBMC)のフローサイトメトリ(FCM)による解析の結果(Ungated)を示した図である。(a)には、PBMCの細胞の大きさ(FS)と光散乱(SS)による二次展開を行った結果を示す。細胞集団は左からリンパ球(lymphocyte)、単球(monocyte)及び顆粒球(granulocyte)に分類された。(b)にはIsotopic controlによるPBMCの染色を行った結果を示す。(c)には、PBMCのFSとSSによる二次展開を行った結果を示す。(d)の図における抗HIDE1抗体陽性細胞をエリアMで示した。(d)には、抗HIDE1抗体によりPBMCを染色し、FCMにより解析した結果を示す。HIDE1陽性細胞にゲートをかけ、エリアMで示した。

[図6]単球マーカーであるCD14に対する抗体と、抗HIDE1抗体との二重染色の結果を示した図である。各図は以下の解析結果を示す。(a)二重染色で分かれた各細胞集団にゲートをかけた(A, B, C)。(b)PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるAの細胞集団(CD14(++) & 抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。(c)PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるBの細胞集団(CD14(+) & 抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。(d) PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるCの細胞集団(CD14(−) & 抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。

[図7]単球マーカーであるCD11bに対する抗体と、抗HIDE1抗体との二重染色の結果を示した図である。各図は以下の解析結果を示す。(a)二重染色で分かれた各細胞集団にゲートをかけた(A, B, C)。(b)PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるAの細胞集団(CD11b(++) & 抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。(c) PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるBの細胞集団(CD11b(+) & 抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。(d) PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるCの細胞集団(CD11b(+) & 抗HIDE1抗体(−))を黒色で示した(破線内)。

[図8]単球マーカーであるCD33に対する抗体と、抗HIDE1抗体との二重染色の結果を示した図である。各図は以下の解析結果を示す。(a)二重陽性の細胞集団にゲートAをかけた。(b) PBMC全体をFSとSSで展開(灰色)し、(a)の図におけるAの細胞集団

(CD33(+)&抗HIDE1抗体(+))を黒色で示した(破線内)。

[図9]抗HIDE1抗体(1H12)によりヒト単球系培養細胞を染色した結果を示した図である。(a)はU937、(b)はHL60、(c)及び(d)はTHP-1を各々培養細胞として用いている。(a)～(c)では、実線が抗HIDE1、破線がIsotypic controlの反応を示す。(d)では、破線が分化前、実線が分化後の細胞に対する抗HIDE1抗体の反応を示す。

[図10]抗hHIDE1抗体(1H12)と骨髄系樹状細胞マーカー(BDCA3)を用いたヒト末梢血細胞(PBMC)の二重染色を示した図である。(a)PBMCの抗HIDE1抗体(1H12)とIsotype controlの二重染色(b)PBMCの抗HIDE1抗体(1H12)とBDCA3の二重染色。

[図11]抗mHIDE1抗体(5F8)と単球マーカー(CD11b)を用いたマウス末梢血細胞(PBMC)、及びマウス脾臓細胞の二重染色を示した図である。(a)マウス末梢血細胞(PBMC)の抗HIDE1抗体(1H12)とIsotype controlの二重染色。(b)マウス末梢血細胞(PBMC)の抗HIDE1抗体(1H12)と単球マーカー(CD11b)の二重染色。(c)マウス脾臓細胞の抗HIDE1抗体(1H12)とIsotype controlの二重染色(d)マウス脾臓細胞の抗HIDE1抗体(1H12)と単球マーカー(CD11b)の二重染色。

[図12]抗mHIDE1抗体(5F8)と樹状細胞マーカー(CD11c)を用いたマウス末梢血細胞(PBMC)、及びマウス脾臓細胞の二重染色を示した図である。(a)マウスPBMCに対する抗HIDE1抗体(1H12)とIsotype controlの二重染色(b)マウスPBMCに対する抗HIDE1抗体(1H12)と樹状細胞マーカー(CD11c)の二重染色(c)マウス脾臓細胞に対する抗HIDE1抗体(1H12)とIsotype controlの二重染色(d)マウス脾臓細胞に対する抗HIDE1抗体(1H12)と樹状細胞マーカー(CD11c)の二重染色

発明を実施するための最良の形態

[0020] [単球マーカー検出用抗体]

本発明により、HIDE1をマーカーとすることにより公知の単球マーカーCD14よりも広く単球を染色でき、またCD11bに比べより特異的に単球を染色できることが明らかになった。そこで、本発明により単球マーカー(HIDE1)検出をするための抗体が提供される。本発明の単球マーカー検出用抗体は、単球の検出を可能にするものであればよく、(1) HIDE1蛋白質、(2) HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジェントな条件下ハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質、または(3)これら

(1)若しくは(2)の蛋白質の少なくとも連続した8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片に結合するものである。中でも、HIDE1蛋白質の単球表面に露出されている抗原部分を認識する抗体が本発明の単球マーカー検出用抗体として特に好ましい。

[0021] ここで、「HIDE1」または「HIDE1蛋白質」とは、HIDE1遺伝子によりコードされるポリペプチドであり、天然より単離された蛋白質の他、該遺伝子を適当な発現系で発現することにより得られる組換え体を含むポリペプチドを意味する。マウスHIDE1遺伝子の塩基配列を配列番号1に、該遺伝子によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。マウスHIDE1の膜貫通領域を含まないスプライスバリアントの存在も確認された。そのスプライスバリアントのアミノ酸配列を配列番号:4に、該バリアントをコードするmRNAの塩基配列を配列番号:3に示す。これら膜貫通型及び分泌型の蛋白質の両方が、本明細書に記載されるHIDE1蛋白質の定義に含まれる。本明細書中の「HIDE1蛋白質」には、これら2種類のマウス蛋白質のみならず、他のバリアント及びアイソフォーム、並びにヒトを含む他の哺乳動物におけるホモログも含まれる。

[0022] ヒトHIDE1のアミノ酸配列を配列番号:6に、それをコードする塩基配列を配列番号:5に示す。マウス及びヒトHIDE1のアイソフォーム及びバリアント、並びにその他の哺乳動物のホモログは、例えば、マウス若しくはヒトHIDE1をコードする遺伝子または遺伝子断片をプローブまたはプライマー等として利用して、適当なcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから、ハイブリダイゼーション、PCR等の慣用の遺伝子クローニング技術により該アイソフォーム、バリアントまたはホモログをコードする遺伝子を取得し、得られた遺伝子を公知の手法により発現させて得ることができる。

[0023] HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、HIDE1遺伝子に対して高い相同意を有し、HIDE1と同等な機能を持つ蛋白質をコードするものと期待される。そこで、本発明の単球マーカー検出用抗体は、このようなヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質に対して結合する抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、上記HIDE1蛋白質またはHIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列にコードされる蛋白質の一部である断片を認識し、特異的に結合する抗体も含まれる。

本発明において、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件としては具体的に

は、例えば5×SSC、ホルムアミド非存在下で25°Cの条件が挙げられる。好ましくは6×SSC、40%ホルムアミドで25°Cで行う。更に好ましくは5×SSC、50%ホルムアミドで40°Cで行う。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、例えば、2×SSC、37°Cで洗浄する。好ましくは1×SSC、55°Cで洗浄する。更に好ましくは1×SSC、60°Cで洗浄する。

[0024] 抗体がある蛋白質を認識して結合し、同じ条件下で他の蛋白質に対する結合が実質的に検出されないとき、その抗体がその蛋白質を特異的に認識していると言うことができる。抗体と蛋白質の結合レベルは、イムノアッセイの原理によって定量的に評価することができる。具体的には、抗体の特異性を評価するには、FACSやELISAなどの方法を用いることができる。FACSにおいては、ポジティブ細胞の計数値に基づいて、抗体の結合レベルを比較することができる。あるいはELISAにおいては、標識抗体のシグナル強度に基づいて、抗体の結合レベルを比較することができる。定量的な結合活性の評価の結果、2つの蛋白質の間で抗体の交差性が50%以下、たとえば20%以下、通常は10%以下、あるいは5%以下のとき、その抗体は対象となる蛋白質を特異的に認識していると言うことができる。たとえばある抗体が、配列番号:5に記載されたヒトHIDE1遺伝子を発現する形質転換細胞に結合し、同じ条件で当該形質転換細胞に用いられた宿主細胞に対する結合が検出されないとき、この抗体は、ヒトHIDE1を特異的に認識する抗体と言うことができる。

[0025] 特に好ましい断片としては、HIDE1蛋白質の親水性領域または表面形成領域を含む断片が挙げられるが、HIDE1蛋白質またはHIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列にコードされる蛋白質の抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。よって、本発明の单球マーカー検出用抗体には、HIDE1蛋白質またはHIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列にコードされる蛋白質の断片であり、8以上(例えば、8、9、10、11、12または15)のアミノ酸残基を有するポリペプチド断片に結合する抗体が含まれる。

[0026] 本発明の抗体はHIDE1抗体を検出できるものであればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体を含むキメラ抗体、可変領域を含む抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等)、多特異性抗体、一本鎖抗体(scFv)等が含まれる。本発明の抗

体は必要に応じPEG等により修飾されていてもよい。さらに、二次抗体を使用することなく検出できるよう、必要に応じ、適当な酵素(アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホフファーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ペルオキシダーゼ、マルトース結合酵素等、グルタチオントランスフェラーゼ)、ビオチン、グリーン蛍光蛋白質(GFP)、放射標識、蛍光標識等によりラベルすることもできる。ビオチンにより標識した場合には、アビジン、ストレプトアビジン等とのビオチンの結合性を利用して抗体の回収を行うことも可能となる。蛍光標識抗体とすることにより、抗体に結合した細胞を、蛍光シグナルを指標としてセルソーターにより分離することもできる。また、磁性粒子に抗体を結合することにより、磁場、磁石を利用した抗体の分離が可能となる。さらに、必要に応じ、本発明の抗体を適当な固相担体等に結合させることもできる。

[0027] 本発明の抗体は、公知の手法により製造することができる。例えば、HIDE1蛋白質、またはその抗原性断片を適当な免疫動物に免疫することよって、免疫動物からHIDE1を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。ここで使用される免疫動物は本発明の抗体を産生することができればよく特に限定されないが、一般的には、抗体の産生にはゲッ歯目(マウス、ラット、ハムスター等)、ウサギ目、靈長目(カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等)に属する動物が利用される。また、ヒト抗体の取得を目的とする場合、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を免疫動物として用いてもよい。

[0028] 本発明の抗体を得るための抗原としては、前述の(1)HIDE1蛋白質、(2)HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質、または(3)これら(1)若しくは(2)の蛋白質の少なくとも連続した8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片を使用することができる。特に好ましい抗原断片として、HIDE1蛋白質の単球表面に露出されている部分を挙げることができる。たとえばヒトHIDE1の場合には、配列番号:6に示すアミノ酸配列中、細胞外ドメインは27-117位のアミノ酸配列に相当する。したがって、ヒトHIDE1の27-117位のアミノ酸配列を含むポリペプチド、並びに27-117位のアミノ酸配列から選択された連続する8アミノ酸以上のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、好ましい抗原断片で

ある。

このような抗原を免疫動物に、例えば、注射等により必要に応じアジュバントと共に投与することにより動物を免疫化することができる。免疫化に際しての抗原投与は、一定間隔を置いて複数回行うことが望ましい。免疫された動物の血清を採取し、血清をポリクローナル抗体として用いてもよいし、必要に応じさらに精製を行ってもよい。

[0029] 更に、所望の活性を有する抗体の產生が確認された動物から抗体產生細胞をクローニングすることによって、モノクローナル抗体を得ることもできる。より具体的には、免疫した動物から脾臓を摘出し、脾臓から免疫細胞を分離し、細胞の不死化を行い、所望のモノクローナル抗体を產生する細胞を選択する。抗体を產生する免疫細胞を不死化する方法としては、癌遺伝子を導入して不死化を行う方法も公知であるが、適當なミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製する方法(例えば、Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46参照)が一般的である。得られた抗体產生細胞を培養し、得られる培養上清をモノクローナル抗体として利用することもできるが、必要に応じ精製してもよい。また、所望のモノクローナル抗体を產生することが確認された細胞を、マウス等の腹腔内に移植することにより、該マウスの腹水から所望のモノクローナル抗体を回収することができる。

[0030] また、得られた抗体產生細胞から抗体をコードする遺伝子のクローニングを行い、遺伝子工学的に抗体を製造することもできる。抗体をコードする遺伝子のクローニングを行うことにより、キメラ抗体、ヒト化抗体、多特異性抗体、scFv等を作製することもできる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。さらに、本発明の単球マーカー検出用抗体には、抗体断片も含まれる。抗体断片は、上記ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等により酵素処理して製造することができる。または、抗体断片をコードするポリヌクレオチド鎖を作製して発現ベクターに挿入し、慣用の方法により発現させることによっても得ることができる。

[0031] 抗体断片を含む本発明の抗体は、プロテインA及びプロテインG等を用いて回収及び精製することができる。また、通常の蛋白質精製法(エタノール沈澱、塩析、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、蒸留、透析、免疫沈降、溶媒抽出、溶媒沈澱、硫酸沈澱等)を組み合せ精製することも可能であ

る。得られた抗体の濃度は、吸光度測定、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等の公知の方法により決定することができる。また、抗体の抗原結合活性も、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定できる。抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を用いてもよい。

[0032] [単球の検出及び／または単離]

本発明の抗体は単球に結合するものであることから、試料中の単球の存在を検出するため、または単球を取得(単離)するために使用することができる。即ち、本発明により単球を検出する方法、及び単離する方法が提供される。単球の検出は、本発明の抗体と単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させ、該抗体に結合した細胞を検出することにより達成することができる。一方、単球の単離は、本発明の抗体と単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させ、該抗体に結合した細胞を回収することにより達成され得る。

[0033] 本発明の単球を検出する方法は、単球が関与する疾患の診断に利用することができる。例えば、炎症性疾患、移植後の拒絶反応、感染症の回復期、単球性白血病等では循環系中の単球が増加することが知られていることから、末梢血等に含まれる単球の検出を行うことによりこれらの症状について診断することができる。また、単球はマクロファージ、樹状細胞等に分化させることができることから、本発明の方法により単離された単球は、マクロファージ及び樹状細胞に分化させて、細胞免疫療法等において利用することができる。

[0034] ここで、「血液細胞試料」としては、これらに限定されるわけではないが、例えば骨髓、末梢血、臍帯血などを挙げることができる。特に好ましい血液細胞試料として末梢血が挙げられる。このような血液細胞試料は、適当な個体から採取することができる。本発明において、個体とは、組織の分化を経て、母体から独立して生存することができるものを指し、成体のみならず、出生直後の個体も含む、全ての生育段階の個体が含まれる。増殖可能な細胞を分離することができる限り、本発明において使用される血液細胞試料を採取する個体の生死は問題とならない。従って、生体、または脳死若しくは心停止状態の個体から、本発明において使用される血液細胞試料を得ることができる。

[0035] また、血液細胞試料を得るための個体は脊椎動物であり、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ等である。特に好ましい個体は、ヒトまたはマウスである。単球を単離するための血液細胞試料は、単離した単球を例えば細胞免疫療法に用いることを目的とする場合には、治療を行う患者本人から採取されたものであることが好ましい。患者自身の細胞を利用することにより、拒絶反応及び感染性病原体感染が起こるリスクを軽減することができる。

[0036] HIDE1及び抗体との結合反応は、イムノアッセイの原理を利用して検出することができる。一般的なイムノアッセイでは、蛋白質または抗体のいずれか一方を固相化することにより、未反応成分と分離して検出を行う。細胞または抗体を固相化する方法は公知である。例えば、化学結合または物理的吸着により固相に直接固定することができる。また、本発明の抗体をビオチン化しておくことにより、アビシン、 streptavidin 等を吸着させた固相に間接的に結合させることも可能である。抗体に磁性粒子を結合することにより、磁石を用いて簡便に短時間で抗体を、ひいては抗体に結合した細胞を検出及び分離することもできる。また、多特異性抗体等の複数の抗原を認識する抗体を用いることにより、単球上のHIDE1と抗体を結合させ、さらに抗体を別の抗原に対して結合させることもできる。また、プロテインAまたはG等を介して抗体を固相に固定することも可能である。

抗体の固相化のタイミングは特に限定されず、試料との接触前、接触後、または接触と同時に得る。抗体を結合する固相としては、任意のものを使用することができる。ガラス、ポリスチレン等の有機高分子、シリカゲル、アルミナ及び活性炭等の無機材料等を素材とする膜状、粒子状または纖維状の担体を挙げることができ、例えば、プレート、シャーレ、試験管等を含む反応容器の内壁、ビーズ等に本発明の抗体を結合させることができる。

[0037] 本発明の単球マーカー検出用抗体を用いて単球を免疫学的に検出または定量する方法としては、蛍光抗体法 (Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, 3rd ed. (1996) Academic Press 参照)、ELISA、RIA、免疫組織染色法、免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法 (例えば、ABC法、CSA法; Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, 3rd ed. (1996) Academic Press 参照)、ウエスタンブロッティング、免疫

沈降法等が挙げられる。

ELISAでは、抗体をペルオキシダーゼ等の容易に検出することができる物質を基質とするかまたは検出可能な生成物を生じる反応を触媒する酵素により標識し、酵素に対する基質を作用させて基質または生成物等の濃度を吸光光度計により測定する。ELISAの一種であるサンドイッチELISAでは、異なる抗原部位に結合する2種類の抗体を用い、抗体の一方に酵素標識を付して分析を行う。RIAでは、抗体に放射線標識を施し、抗体の検出はシンチレーションカウンターを用いて検出・定量することができる。免疫組織化学染色法では、抗体を蛍光物質、酵素等により標識し、組織、細胞等と反応させた後、顕微鏡を用いて蛍光、酵素反応により生成した色素等を観察して、抗体と反応する物質の組織及び細胞における局在を調べることができる。免疫沈降法では、抗体と細胞とを反応させた後、反応液にプロテインG-セファロース等の免疫グロブリン特異的に結合する担体を添加して、抗原抗体複合体を沈降させる。

[0038] 特に好ましい単球の検出及び／または分離方法として、フルオレシン・イソチオシアネート(FITC)またはフィコエリスリン等で蛍光標識した抗体を使い、蛍光シグナルを指標としてセルソーターによって目的の細胞を検出・分離する方法を挙げることができる。波長の異なる蛍光色素で標識された、異なる細胞表面抗原に結合する抗体を組み合せれば、複数の細胞表面抗原によって細胞を選択することができる。また、別の好ましい方法として、抗体を固定化した磁性粒子に細胞を反応させ、目的とする細胞を磁性粒子に捕捉することができる。磁性粒子と結合した細胞を、MACS(第一化学)等の磁石装置を用いて分離し、目的とする細胞を回収できる。単一細胞表面抗原で細胞を選択し、磁性粒子を用いて分離する方法は、簡便であり、本発明の単球の検出・単離方法として特に好ましいものである。

[0039] 単離した細胞は、好ましくは血清及びアミノ酸を補った当業者に周知の種々の培地(RPMI、IMDM等)中で培養することができる。培養は、滅菌条件下で、好ましくは37°Cで行う。その他の培養条件は、細胞の使用目的等に応じ当業者が適宜決定することができる。

[0040] 単球マーカーとしてCD14が知られており、CD14陽性単球から生成した樹状細胞は免疫細胞療法にも用いられている(Pickl et al., J. Immunol. (1996) 157:3850-9;

Jefford et al., *Blood* (2003) 102: 1753)。単球を樹状細胞へと分化させた場合、細胞表面のCD14及びHIDE1の発現はどちらも低下するが、HIDE1の方がCD14よりも明らかに早く(分化誘導より2~3日で)消失した。即ち、単球から樹状細胞へ分化する過程において、CD14陰性HIDE1陽性という状態が存在する。つまり、従来の単球マーカーCD14よりも、本発明のHIDE1の方が単球特異的に発現している可能性が示唆された。従って、本発明のHIDE1を指標とした単球の検出・単離方法によって、より純粋な単球細胞集団が取得されるものと期待される。よって、本発明の一態様として、HIDE1をマーカーとして単離される、従来のマーカーを用いて得られる細胞集団よりもより純粋な単球細胞集団が提供される。

[0041] [キット]

本発明の単球マーカー検出用の抗体は、単球の検出及び/または単離等に必要とされる物質と組み合せて単球検出または単離用キットとすることができます。例えば、抗体の検出に必要とされる試薬・装置等を本発明の抗体と組み合せたキットとすることができる。例えば、本発明の抗体を検出するための二次抗体、抗体が酵素により標識されている場合には、該酵素が触媒する反応基質、酵素が磁性粒子に結合されている場合には磁石等をキットに含めることができる。さらに、単球の培養に適した培地、単球からマクロファージまたは樹状細胞の分化に必要とされるサイトカイン等をキットとして、本発明の抗体と組み合せててもよい。好適には、キットに含まれる抗体の単球検出及び単離のための使用方法、単離された単球の培養方法、分化誘導方法等の手順を記載した説明書をキットに添付する。

[0042] [単球の分化・誘導]

単球は適当なサイトカインを作用させることにより、マクロファージ(Nature (1987) 325:262-5; Nature (1986) 323: 86-9; J. Immunol. (1988) 140: 1345-9; Jpn. J. Cancer Res. (1989) 80: 59-64)、樹状細胞(例えば、Thurnher et al., *Exp. Hematology* (1997) 25: 232-7; Schuler and Steinman, *J. Exp. Med.* (1997) 186: 1183-7参照)、破骨細胞(Lacey et al., *Endocrinol.* (1988) 136: 2367-76; Mundy, *Bone and Miner. Res.* (1993) 8: S505-10; 特開平11-196864号)等に分化することが知られている。本発明の単球マーカー検出用抗体を用いて単離される単球もこれら

公知の手法により分化・誘導することができる。よって、本発明の一態様として、本発明の抗体により単球を単離し、さらに単離された単球をマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞等に分化させる方法が挙げられる。

[0043] 本発明によりさらに、ヒト末梢血の単球からGM-CSF及びIL-4によって分化・生成させた樹状細胞、及び単球系培養細胞のTHP-1を分化誘導因子であるホルボールエステルによって分化させたマクロファージ様細胞ではHIDE1の発現が減少または消失していることが確認された。即ち、in vitroにおいて単球からマクロファージまたは樹状細胞を誘導する際に、HIDE1の発現レベルをモニターすることにより、単球からこれらの細胞への分化を確認することができる。よって、本発明により、HIDE1の発現レベルにより細胞の分化を確認するマクロファージまたは樹状細胞を単球より誘導する方法が提供される。

[0044] 本発明のin vitroにおいて単球より樹状細胞を誘導する方法は、(1)単球細胞を樹状細胞分化誘導因子の存在下で培養する工程、及び(2)培養された細胞におけるHIDE1の発現を本発明の抗体を用いて検出する工程を含むものである。また、本発明のin vitroにおいて単球よりマクロファージを誘導する方法は、(1)単球細胞をマクロファージ分化誘導因子の存在下で培養する工程、及び(2)培養された細胞におけるHIDE1の発現を本発明の抗体を用いて検出する工程を含むものである。どちらの方法でも、工程(2)においてHIDE1の発現レベルが低下した場合に、単球が樹状細胞またはマクロファージに分化したと判断することができる。

[0045] 樹状細胞(DC)は、公知の手法により単球から誘導することができる(例えば、J. Leukocyte Biol. (1996) 59: 208-18; Thurnher et al., Exp. Hematology (1997) 25: 232-7; Schuler and Steinman, J. Exp. Med. (1997) 186: 1183-7参照参照)。これら公知の方法でDCの分化誘導に使用されるサイトカインを本発明の単球よりDCを誘導する方法でも樹状細胞分化誘導因子として採用することができる。特に、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及びIL-4存在下で培養されたヒト単球は、抗原の細胞内への取り込み(食作用)及びその抗原情報をT細胞に伝え、活性化する能力を有することが報告されている(J. Leukocyte Biol. (1996) 59: 208-18)。よって、GM-CSF及びIL-4の組み合せは、本発明の方法における樹状細胞分化誘導因子と

して特に好ましいものである。

[0046] DCはその分化段階により未成熟DCと成熟DCに分類される。成熟樹状細胞は、T細胞増殖の誘導、CD80、CD86、CD83、MHC-I、MHC-II等の発現を特徴とする。食作用は未成熟DCで強く、成熟DCでは弱くなる。逆にT細胞への抗原提示能は、それに関与するCD40、CD80、CD86、MHC-I、MHC-IIの発現程度と一致しており、未成熟DCで弱く、成熟DCで強くなる。本発明の抗体により単球からの分化が確認されたDCを、未成熟と成熟DCを区別するこれらの性質及び／またはマーカーを指標としてさらに分類することもできる。

[0047] ヒト末梢血から単離された単球をIL-1、IL-2、腫瘍壞死因子(TNF)又はインターフェロン γ (IFN- γ)等の存在下、血清含有培地中で18～48時間培養することにより細胞傷害活性を有するマクロファージを誘導できることが報告されている(Nature (1987) 325: 262-5; Nature (1986) 323: 86-9; J. Immunol. (1988) 140: 1245-9; Jpn. J. Cancer Res. (1989) 80: 59-64)。特開平5-130863号公報には、IL-2及びIL-1またはCSF-1を併用することにより、極めて高い細胞傷害活性を有するマクロファージが得られることが報告されている。これら公知の方法でマクロファージの分化誘導に使用されるサイトカインを本発明の単球よりマクロファージを誘導する方法でもマクロファージ分化誘導因子として採用することができる。実施例において使用されているホルボールエステルは、本発明の方法におけるマクロファージ分化誘導因子として特に好ましいものである。

[0048] 樹状細胞及びマクロファージの誘導に使用する単球細胞は特に限定されず、末梢血、臍帯血、骨髄等から得られるものの他、THP-1、HL60及びU937等の単球系培養細胞が含まれる。単球の分化誘導は、好ましくは血清及びアミノ酸を補った当業者に周知の種々の培地(RPMI、IMDM等)中で行われる。細胞の培養は、滅菌条件下で、好ましくは37°Cで行う。単球からの樹状細胞の分化誘導には、5～7日間、マクロファージの分化誘導には18～24時間かかることが知られていることから、好ましくは、樹状細胞を分化させる場合には5日以上、またマクロファージを分化させる場合には18時間以上培養を持續させる。その他の培養条件は、細胞の使用目的等に応じ当業者が適宜決定することができる。

[0049] [樹状細胞及びマクロファージを取得する方法]

上述の単球を単離する方法、及び単球より樹状細胞またはマクロファージを誘導する方法を応用することにより、血液細胞試料より樹状細胞及びマクロファージを取得することができる。即ち、本発明により樹状細胞及びマクロファージを取得する方法が提供される。樹状細胞は腫瘍、リウマチ等の自己免疫疾患の予防及び／若しくは治療、または臓器移植における拒絶反応の緩和に利用できることが知られており、本発明の方法により取得される樹状細胞もこれらの用途に使用することができる。

[0050] 一方、マクロファージは、脊髄損傷の治療、腫瘍、感染性疾患、自己免疫疾患及び免疫不全疾患の治療及び予防での使用が提案されており、本発明の方法により取得されるマクロファージもこのような用途に使用することができる。さらに、マクロファージは高い生合成能を有し、サイトカイン、増殖因子、炎症性メディエーター、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターを含む生物学的に活性な重要な巨大分子を分泌することが知られ、且つ、ある程度分化した段階のマクロファージは、限られた寿命しか有さず、炎症部位への遊走する性質等から遺伝子治療用の細胞の候補としても提案されている(特表2001-504683号公報)。本発明の方法により取得されるマクロファージは、このような遺伝子治療用の細胞としても利用することができる。

[0051] 本発明の樹状細胞(DC)を取得する方法は、(1)血液細胞をDC分化誘導因子の存在下で培養する工程、(2)培養された細胞を本発明のHIDE1マーカー検出用抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現の減少が検出された場合に単球細胞がDCに分化したと判定する工程、及び(3)DCに分化したと判定された細胞を単離する工程を含むものである。DCに分化させる血液細胞は単球を含んでいることが必要条件であるが、より均一なDC集団を得るために、単離された単球をDC取得のための出発材料とすることが好ましい。

[0052] 好適な単球を含む血液細胞は、例えば(1)血液細胞試料を本発明のHIDE1マーカー検出用抗体と接触させ、続いて(2)抗体と結合した血液細胞を回収することにより得ることができる。ここで用いる血液細胞試料は単球を含むものである限り特に限定されないが、骨髓、末梢血、臍帯血などが例示され、特に好ましいものとして末梢血が挙げられる。このような血液細胞試料は、適当な個体から採取することができる。し

かしながら、単離した単球より得られるDCを疾患の治療または予防を目的として患者に投与する場合には、拒絶反応及び感染性病原体感染のリスクを避けるため、投与する患者本人から採取された血液細胞試料を用いることが好ましい。

[0053] よって、本発明のDCを取得する方法の一態様として、(1)採取された血液細胞試料を本発明の抗体と接触させる工程、(2)抗体と結合した血液細胞を回収する工程、(3)回収された血液細胞をDC分化誘導因子存在下で培養する工程、(4)培養された細胞を本発明の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞がDCに分化したと判定する工程、及び(5)分化したと判定された細胞をDCとして単離する工程を含む方法が提供される。

[0054] DCはその分化段階により未成熟DCと成熟DCに分類される。成熟DCは、T細胞増殖の誘導、CD80、CD86、CD83、MHC-I、MHC-II等の発現を特徴とする。食作用は未成熟DCで強く、成熟DCでは弱くなる。逆にT細胞への抗原提示能は、それに関与するCD40、CD80、CD86、MHC-I、MHC-IIの発現程度と一致しており、未成熟DCで弱く、成熟DCで強くなる。本発明の抗体により単球からの分化が確認されたDCを、未成熟と成熟DCを区別するこれらの性質及び／またはマーカーを指標としてさらに分類することもできる。

[0055] 生体内に外来抗原が侵入した場合に起こる免疫反応では、外来抗原を貧食したDCがリンパ節に移動し、リンパ球に対して抗原を提示することから、体内外の外来抗原が存在する領域に直接、未成熟のDCを注入することにより外来抗原の侵入が関与する疾患の治療を行うことができる。腫瘍等の病巣内に直接DCを注入する治療法(樹状細胞腫瘍内局注療法(DCI))が実施されており、本発明の方法により取得されたDCもこのような病巣部への直接投与による腫瘍の治療に用いることができる。

[0056] また、未成熟DCを利用した、リウマチなどの自己免疫疾患の治療及び予防法、並びに臓器移植における拒絶反応の緩和法等も公知である。たとえば未成熟DCの投与によって、IL-10の産生、あるいはナイーブT細胞からIL-10産生抑制性T細胞を分化させることができると考えられている。IL-10は、自己の細胞を攻撃するT細胞、あるいはドナー由来の臓器を攻撃するT細胞に、アナジー(不応答性、あるいはアネルギー)を誘導する作用を有する。より具体的には、IL-10は、1型ヘルパーT細胞やキラ

一細胞の発生やその活性を抑制する作用を有する。このようなメカニズムに基づいて、自己組織の損傷や移植片に対する拒絶が、未成熟DCの投与によって緩和されると考えられている。本発明の方法により取得されたDCはこれらのことにも使用することができる。

[0057] また、DCが抗原を提示する能力を利用して、DCを体内へ導入する前にin vitroにおいて抗原を取り込ませてから細胞免疫療法に利用する方法も公知である。そこで、本発明のDCを取得する方法の一態様として、DCに分化したと判定された細胞に抗原を取り込ませる工程をさらに含む方法が挙げられる。抗原はDCと接触させる、例えばDCの培地中に添加することにより取り込ませることができる。抗原分子をDCに接触させる際に、培地中にTNF- α 等のサイトカインを添加してもよい。確実にDCに抗原を提示させるために、抗原との接触は数時間から数日、好ましくは4時間～48時間接触を行わせる。必要に応じ、接触させている間に、培地の交換、サイトカイン及び抗原の追加を行うことができる。

[0058] DCに導入する抗原としては、患者から得られた抗原成分、及び人工的に製造した公知の抗原とが挙げられる。例えば、癌の再発、転移を抑制することを目的とする場合、自己癌より抽出した抗原(癌細胞溶解物、酸抽出ペプチド等)、または、対象とする癌についての腫瘍特異的抗原が公知の場合には、人工的に作られた該腫瘍特異的抗原ポリペプチドをDCに取り込ませる抗原とする。癌の予防を目的とする場合には、公知の腫瘍特異的抗原を用い、癌の治療を目的とする場合には、腫瘍特異的抗原を用いてもよいが、自己癌より抽出した抗原(癌細胞溶解物、酸抽出ペプチド等)を利用することもできる。

[0059] 本発明者らは、ヒト末梢血を血液試料として用い、HIDE1陽性細胞を回収することによって、単球に加えて、骨髓系樹状細胞が単離できることを明らかにした。つまり樹状細胞の誘導を目的としてその前駆細胞である単球を得るときに、HIDE1をマーカーとすれば、単球に加えて、樹状細胞をも回収できることを意味する。細胞数は少ないものの、末梢血中にHIDE1陽性骨髓系樹状細胞が存在することは、本発明者らが見出した新規な知見である。すなわち本発明は、以下の工程を含む、末梢血から単球および骨髓系樹状細胞を単離および／または検出するための方法を提供する。

- (1) 抗HIDE1抗体と、末梢血試料とを接触させる工程、及び
- (2) 工程(1)において、抗体と結合した血液細胞を単球および骨髓系樹状細胞として回収する工程

あるいは本発明は、抗HIDE1抗体を含む、末梢血中の単球および骨髓系樹状細胞を単離および／または検出するための試薬を提供する。また本発明は、抗HIDE1抗体の、末梢血中の単球および骨髓系樹状細胞を単離および／または検出するための試薬の製造における使用に関する。

[0060] 一方、本発明のマクロファージを取得する方法は、(1)血液細胞をマクロファージ分化誘導因子の存在下で培養する工程、(2)培養された細胞を本発明のHIDE1マーカー検出用抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現の減少が検出された場合に単球細胞がマクロファージ様細胞に分化したと判定する工程、及び(3)マクロファージ様細胞に分化したと判定された細胞を単離する工程を含む。マクロファージに分化させる血液細胞は単球を含んでいることのみが必要条件であるが、より均一なマクロファージ細胞集団を得るために、単離された単球をマクロファージ取得のための出発材料とすることが好ましい。

好適な単球を含む血液細胞は、例えば(1)血液細胞試料を本発明のHIDE1マーカー検出用抗体と接触させ、続いて(2)抗体と結合した血液細胞を回収することにより得ることができる。ここで用いる血液細胞試料は単球を含むものである限り特に限定されないが、骨髓、末梢血、臍帯血などが例示され、特に好ましいものとして末梢血が挙げられる。このような血液細胞試料は、適当な個体から採取することができる。

[0061] しかしながら、単離した単球より得られるマクロファージを疾患の治療または予防を目的として患者に投与する場合には、拒絶反応及び感染性病原体感染のリスクを避けるため、投与する患者本人から採取された血液細胞試料を用いることが好ましい。よって、本発明のマクロファージを取得する方法の一態様として、(1)採取された血液細胞試料を本発明の抗体と接触させる工程、(2)抗体と結合した血液細胞を回収する工程、(3)回収された血液細胞をマクロファージ分化誘導因子存在下で培養する工程、(4)培養された細胞を本発明の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞がマクロファージ様細胞に分化したと判

定する工程、及び(5)分化したと判定された細胞をマクロファージとして単離する工程を含む方法が提供される。

[0062] マクロファージは高い生合成能を有し、サイトカイン、増殖因子、炎症性メディエーター、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビター、活性酸素、一酸化窒素を含む生物学的に活性な重要な巨大分子を分泌し、腫瘍細胞傷害性、貧食作用及び殺微生物活性等を有することが知られている。このようなマクロファージの性質から、マクロファージを生体外において活性化させてから患者に投与する養子免疫療法が提案されている。そこで、本発明のマクロファージを取得する方法の一態様として、マクロファージに分化したと判定された細胞を活性化させる工程をさらに含む方法が挙げられる。マクロファージの活性化には、マクロファージの機能を活性化することが知られているマクロファージ活性化因子を利用することができる。マクロファージの活性化は、例えば、IFN- γ 、IFN- α ／ β 、IL-1、TNF、GM-CSF、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)等のマクロファージ活性化因子を培地に添加することにより行うことができる。

[0063] [リンパ球の回収・取得]

本発明により、HIDE1は主に単球に発現しており、リンパ球には発現していないことが明らかとなった。そこで、末梢血等のリンパ球及び単球を含む試料から本発明の抗HIDE1抗体と結合させることにより単球を除くことにより、リンパ球の該試料からの回収を助けることができる。即ち、本発明により(1)本発明の抗体とリンパ球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び、(2)抗体に結合されなかった血液細胞を回収する工程を含むリンパ球の回収方法が提供される。

[0064] 本発明の方法により回収されるリンパ球は、リンパ球が有効であることが知られる腫瘍及び特にウイルス感染などの感染性疾患等の予防及び治療に用いることができる。養子免疫療法として、患者自身から得られたリンパ球を体外において活性化してから患者に投与する方法が知られている。そこで、本発明の態様として、本発明の抗体を利用して回収されたリンパ球をさらに生体外において活性化して活性化リンパ球を取得することができる。

[0065] リンパ球を回収するための血液細胞試料としては、単球を含むものである限り特に限定されず、骨髓、末梢血、臍帯血などが例示され、特に好ましいものとして末梢血

が挙げられる。このような血液細胞試料は、適当な個体から採取することができる。しかしながら、回収したリンパ球を疾患の治療または予防を目的として患者に投与する場合には、拒絶反応及び感染性病原体感染のリスクを避けるため、投与する患者本人から採取された血液細胞試料を用いることが好ましい。様々なサイトカインがリンパ球を活性化する能力を有することが知られている。例えば、末梢血リンパ球にIL-2を作用させることにより、高い抗腫瘍活性を有するリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞が得られることが知られている(活性化リンパ球療法; J. Immunol. (1984) 132: 2123-8; J. Exp. Med. (1982) 155: 1823-41)。そこで、本発明の方法により回収されるリンパ球をIL-2により活性化することにより、LAK細胞を得ることができる。

[0066] [細胞の投与]

上記本発明の方法により得られる単球、樹状細胞、マクロファージ及びリンパ球は、種々の疾患の治療及び予防、QOLの改善等を目的として患者に投与することができる。従って、本発明により、これらの細胞のうち1または複数を患者に投与する方法、これらの細胞を用いた治療及び予防方法、並びに、これらの細胞の治療及び予防における使用が提供される。上述の各方法により単離、取得または回収された細胞を、必要に応じ培養し、増幅及び／または活性化し、目的とする細胞を回収した後、必要に応じて洗浄、分画、濃縮等の処理を行い、患者に投与することができる。細胞の投与は、静脈内、腹腔内、胸腔内、腫瘍内、動脈内等、各症例及び細胞の種類に応じ適切な部位を選択して行う。各細胞の投与量は、患者の体格、性別、年齢、症状等、及び細胞の種類に応じて当業者が適宜調整することができる。細胞は、患者への投与に当たって、任意の媒体注に浮遊させることができる。細胞の分散に好適な媒体としては、生理食塩水等を示すことができる。

[0067] 活性化リンパ球(LAK)療法の対象疾患としては、癌及び肉腫等の悪性腫瘍が挙げられ、その再発予防(外科手術により癌病巣摘出後の再発予防)、治療、QOLの改善を目的として治療が行われている。その他、C型肝炎、B型肝炎等のウイルス感染症にも効果が認められており、患者の免疫力を増強すること、発癌予防等を目的としてウイルス感染症に対しても行われている。具体的には、患者から適当量(約15ml)の血液を採血し、本発明の方法によりリンパ球を取り出し、約2週間の培養によりリンパ

球を可能な限り増殖させ、活性化されたリンパ球を患者の身体に戻す。

[0068] 悪性腫瘍の再発予防を目的とする場合には、病巣摘出後、約2週間毎にLAK細胞を6回投与し、以後、月に1回の投与を2~5年間継続する。再発癌及び手術をすることができない部位の癌の場合にも行うことができ、この場合、LAK細胞を毎週1回くらいの頻度で投与し、効果が認められた場合には、その後も継続して投与を行うことが望ましい。また、抗癌剤等による治療と平行して、相乗効果及び副作用の軽減を目的として、LAK療法を行うこともできる。抗癌剤等との併用療法を行う場合には、他の療法を行う前に治療に必要とされる血液の採取を行っておくことが望ましい。本発明の方法により回収されるリンパ球、及び得られる活性化リンパ球も、従来の用いられてきたリンパ球と同様な方法により患者へ投与することができる。

[0069] 樹状細胞(DC)療法も、癌、肉腫等の悪性腫瘍の再発予防、治療を目的として行われる。またDCは、臓器移植の拒絶及び自己免疫疾患において寛容性を提供するのにも重要である。DCによる細胞免疫療法の場合、患者の血液等から得られた細胞を直接腫瘍等の病巣に投与する他、腫瘍特異的抗原をDCに取り混ませる方法が取られる。腫瘍特異的抗原をDCに取り込ませる方法としては、患者から得られた腫瘍細胞から取り出した成分を与える方法と、人工的に製造した公知の腫瘍特異的抗原を与える方法とがある。

[0070] 特に外科的に癌病巣を摘出した後の再発予防、または肝臓、肺、リンパ節、皮下等への転移癌、再発癌の治療を目的として行われる。基本的に抗原を取り込ませたDCはリンパ節周囲への皮内注射により投与するが、腫瘍の種類、部位等により胸腔内、腹腔内への投与を選択することもできる。腫瘍等の病巣への直接投与を目的とする場合、必要に応じCTを利用することもできる。消化器癌、悪性黒色腫、B細胞性腫瘍及び慢性骨髄性白血病等の造血器腫瘍、乳癌などについて、樹状細胞を利用した治療及び予防が報告されている。従来、DCを直接腫瘍内に投与する場合の細胞の投与量は約 1×10^8 個の細胞である。本発明の方法により得られるDCも、従来の用いられてきたDCと同様な方法により患者へ投与することができる。

[0071] マクロファージは、腫瘍、感染性(特にウイルス性)疾患、自己免疫疾患及び免疫不全疾患の治療及び/または予防に使用されている。また、マクロファージによる脊髄

損傷の治療も知られている。本発明の方法により得られるマクロファージも、従来の用いられてきたマクロファージと同様な方法により患者へ投与することができる。

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0072] 1. 抗HIDE1抗体の取得

HIDE1のヒト相同分子に対するモノクローナル抗体を次のようにして作製した：まず、ヒトHIDE1遺伝子を胎盤cDNAライブラリーからPCR法によって増幅し、得られたPCR産物を動物培養細胞発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) にクローニングした (pcDNA-hHIDE1)。構築されたベクターでは、ヒトHIDE1 (hHIDE1) のC末側にMycタグが融合されている。pcDNA-hHIDE1をリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いてヒト培養細胞293Tに一過性に導入し、その結果得られたh HIDE1発現細胞を抗原として、Balb／Cマウスに免疫した。免疫されたマウスのリンパ節から回収したリンパ球を、ミエローマP3U1と細胞融合させ、10日後に各クローンの細胞上清をサンプリングした。フローサイトメトリ (FCM) によりh HIDE1発現株と反応する細胞上清を選択し、抗HIDE1抗体を產生するハイブリドーマを得た。

[0073] 2. フローサイトメトリ (FCM)

h HIDE1発現293T及び野生型293Tをそれぞれ、2mM EDTA、0.5% BSA入りのPBSに懸濁し、それぞれ 1×10^5 細胞／ウェルの細胞濃度で96wellフレキシブルプレート (FALCON) に撒いた。700g、4°Cで2分間遠心 (TOMY Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX120) し、上清を廃棄した。Fcレセプターブロックを各ウェルに $5 \mu l$ ずつ添加して5分間静置した後、バイブリドーマ (1H12) 上清を $50 \mu l$ ／well添加し、室温で30分静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5% BSA入りのPBSで10倍希釈したIsotopic control IgG2a (Immunotech) を使用した。抗体との反応後、各ウェルに2mM EDTA、0.5% BSA入りのPBSを $100 \mu l$ 添加し、700g、4°Cで2分間遠心して上清を廃棄した。これをもう一度繰り返して洗浄を行った。洗浄後の細胞に、2mM EDTA、0.5% BSA入りのPBSで200倍希釈したGoat F(ab')2 Fragment Mouse IgG (H

+L)-PE (Immunotech) を $40 \mu l/well$ で添加し、室温で30分間静置した。二次抗体の反応後、洗浄を3回行い、細胞を2mM EDTA、0.5%BSA入りの1ml PBSで懸濁し、フローサイトメーター (Cytomics FC500 Beckman counter) で解析を行った。結果を図4aに示す。

[0074] 3. 抗 HIDE1抗体によるPBMCの染色

ヒトHIDE1の血球における発現を調べるために、末梢血単核球画分 (PBMC) に対する抗 HIDE1抗体の反応性を調べた。まず、ヒト末梢血から、HISTOPAQUE-1077 (Sigma) を用いてPBMCを単離した。以下、PBMCを用いて2. のFCMと同じ操作を行った。より具体的には、フローサイトメトリを用いてPBMCを細胞の大きさと光散乱で二次展開することにより、リンパ球、単球、及び顆粒球の3つの細胞集団に分ける一方、抗HIDE1抗体による単染色を行った。その結果、HIDE1は主に単球に発現しており、リンパ球には発現していないことが分かった。顆粒球にも若干の発現が認められたが、単球の染色に比べてあきらかに弱かった(図5)。この結果は、HIDE1が単球の新しいマーカーとして使用できる可能性を強く示唆している。

[0075] 4. 抗HIDE1抗体と他の分化マーカーを用いたPBMCの二重染色

PBMCを、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで懸濁し、それぞれ 1×10^5 cell/wellの細胞濃度で96wellフレキシブルプレート (FALCON) に撒いた。700g、4°Cで2分間遠心 (TOMY Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX120) し、上清を廃棄した。Fcレセプターブロックを各ウェルに $5 \mu l$ ずつ添加して5分間静置した後、バイブリドーマ (1H12) 上清を $50 \mu l/well$ 添加し、室温で30分静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBS で10倍希釈したIsotypic control IgG2a (Immunotech) を使用した。

抗体との反応後、各ウェルに2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSを $100 \mu l$ 添加し、700g、4°Cで2分間遠心して上清を廃棄した。これをもう一度繰り返して洗浄を行った。洗浄後の細胞に、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBS で200倍希釈したGoat F(ab')2 Fragment Mouse IgG (H+L)-FITC (Immunotech) を $40 \mu l/well$ で添加し、室温で30分間静置した。二次抗体の反応後、洗浄を3回行った。細胞を洗浄後、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで10倍希釈したPEラベルされた抗体を $50 \mu l$ ずつ添加し、30分間

室温で静置した。使用した抗体は、CD11b、CD14、CD33、Isotypic control IgG1 (Immunotech)である。洗浄を3回行い、FCM用チューブに移し、PBSで1mlにしたサンプルをフローサイトメーターで測定した。

[0076] HIDE1の単球における発現様式をさらに詳細に検討するため、単球マーカーの1つであるCD14(ref.2)を用いて抗HIDE1抗体との二重染色を行った(図6)。その結果、CD14陽性細胞の99%にHIDE1の発現が認められた(図6bとc)。またCD14陰性HIDE1陽性細胞はPBMC中に約2%存在することから(図6d)、抗HIDE1抗体によりCD14陰性単球を判別できる可能性がある。つまり、抗HIDE1抗体によってCD14よりも広く単球を染色できる可能性が期待できる。

[0077] 別の単球マーカーであるCD11b(ref.3)と抗HIDE1抗体との二重染色を行った結果(図7)、CD11b強陽性の細胞集団のほとんどがHIDE1で染色された(図7b)。一方、CD11b弱陽性の細胞集団においてはHIDE1陰性と陽性の細胞集団に分かれた。CD11b弱陽性HIDE1陽性の細胞集団は主に単球であったが(図7c)、CD11b弱陽性HIDE1陰性の細胞集団はリンパ球であった(図7d)。この結果は、HIDE1はCD11bよりも単球を特異的に染色できることを意味している。

さらにもう1つの単球マーカーであるCD33(ref.4)と抗HIDE1抗体による二重染色を行った結果(図8)、HIDE1陽性細胞のうち、CD33陽性細胞の割合は98%を占め、またCD33陽性細胞中のHIDE1陽性細胞の割合は94%であった(図8b)。以上の結果から、HIDE1は単球の全く新しいマーカーであることが判明した。

[0078] 5. 抗HIDE1抗体によるヒト培養細胞の染色

また、抗HIDE1抗体を用いたヒト培養細胞の染色のために、2. のFCMと同じ操作を行った。今回用いたヒト培養細胞は、THP-1、HL60及びU937である。その結果、HIDE1は、HL60、U937及びTHP-1等の単球系のヒト培養細胞においても発現が認められた(図9)。したがってこれらのヒト単球系培養細胞を用いてHIDE1の機能解析を行うことが可能である。

[0079] mRNAの発現を検出した結果、マウスにおいてHIDE1は脾臓由来の樹状細胞に発現していることが明らかになった。さらに、ヒト脾臓cDNAライブラリーでもHIDE1遺伝子が検出されることから、ヒトの脾臓中の樹状細胞にHIDE1が発現している可能性が

示された(データ示さず)。しかし、ヒト末梢血の単球からGM-CSF及びIL-4によって分化・生成させた樹状細胞ではHIDE1は発現していなかった(データ示さず)。

[0080] また、単球系培養細胞のTHP-1を分化誘導因子であるホルボールエステルによってマクロファージ様細胞に分化させると、HIDE1の発現は著しく減少した(図9d)。これらの結果はHIDE1が単球に特異的に発現していることを強く示唆しており、HIDE1が単球マーカーとして利用できることを強調している。これらの結果から、ヒトHIDE1は、単球の分化及び／または増殖に関与している可能性が示唆され、さらにはミエロイド系白血病にも関与しているかもしれない。今後、HIDE1のリガンドを同定することにより、HIDE1の生体内における機能を解明できるものと考えられる。

[0081] 6. ウエスタンブロッティング

hHIDE1発現293T(H)と、コントロールのために他のMycタグ融合タンパク質を発現している293T(C)をSDS-PAGE用緩衝液中に調製し、12.5%のSDS-PAGEゲルを用いて電気泳動を行った。SDS-PAGEにより展開されたタンパク質をPVDF膜(ミリポア)に転写し、プロット膜をブロックエース(大日本製薬)で2時間ブロッキングした。次に、プロット膜をハイブリドーマ上清(3F12)と室温で1時間反応させた。293TがHIDE1を発現していることを確かめるために、ブロックエースで6000倍に希釈した抗Myc-tagモノクローナル抗体(MBL)を、プロット膜と反応させた。

次に0.5%のTween20を含むPBSで膜を洗浄後、青Buffer(20mM HEPES、1%BSA、135mM NaCl、0.1%p-ヒドロキシフェニル酢酸、0.15%cathonCG、10 μg/mlブロモフェノールブルー)で3000倍希釈した抗マウスIgG conj. POD(MBL)と室温で1時間反応させた。二次抗体との反応後、メンブレンの洗浄を行い、Super signal(Pierce)によって化学発光を行い、目的のバンドを検出した。アミノ酸配列から算出したhHIDE1の分子量は19kDaであるが、hHIDE1の細胞外ドメインは4箇所糖鎖修飾を受けるため、その結果として23kDaと28kDa付近にバンドがシフトして検出されている(図4b)。

[0082] 7. 免疫沈降

hHIDE1発現293T(H)と、他のタンパク質を発現している293T(C)の各細胞懸濁液1ml(2×10^7 細胞/ml)に対し、0.5mgのビオチン(Pierce)を加え、4°Cで1時間転倒攪拌した。4°C、200gで5分間遠心して得た沈殿をPBSで4回洗浄した。洗浄後の沈殿に

、溶解バッファー(10mM Tris-HCl pH7.5、1%NP-40、150mM NaCl、×200 Protease inhibitor cocktail(Sigma))を1ml加え、氷中に30分間、5分おきに転倒混和した。その後、20,400g、15分間遠心して、上清を回収し、50 μ lのrProteinA Sepharose FastFlow(Amersham Biosciences)に加えた。4°C、30分間の転倒攪拌を行った後、4°C、600gで1分間遠心をしてさらに上清を回収した。この攪拌をもう一度繰り返した。

上清を抗HIDE1抗体が結合したSepharose(抗体產生ハイブリドーマ(3H3)上清1mlを50 μ lのrProteinA Sepharose FastFlowに加え、4°Cで1時間ローテーションしたもの。)と混和し、4°Cで1時間転倒攪拌した。これを5回洗浄した後、ペレットをSDS-PAGE用緩衝液で調整し、12.5%のSDS-PAGEゲルを用いて電気泳動を行った。6. と同様に展開したタンパク質をPVDF膜に転写し、青バッファーで10000倍希釈したアビジンconj. POD(MBL)と反応させた後、Super signalによって化学発光を行い、目的のバンドを検出した。結果を図4cに示す。

[0083] 8. 抗hHIDE1抗体と骨髄系樹状細胞マーカーBDCA3を用いたPBMCの二重染色
健常者から採取したPBMCを、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで懸濁し、それぞれ 1×10^5 cell/wellの細胞濃度で96wellフレキシブルプレート(FALCON)に撒いた。700g、4°Cで2分間遠心(TOMY Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX120)し、上清を廃棄した。Fcレセプターブロック(1mg/ml human IgG)(Sigma)を各ウェルに10 μ lずつ添加して室温に10分間静置した後、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで10倍希釈したBDCA3-PE抗体(Miltenyi Biotec)を50 μ l添加し、1時間、4°Cで静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで10倍希釈したIsotypic control IgG1-PE(Immunotech)を使用した。抗体との反応後、各ウェルに2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSを100 μ l添加し、700g、4°Cで2分間遠心して上清を廃棄した。これをもう一度繰り返して洗浄を行った。洗浄後の細胞にFITCラベルしたhHIDE1精製抗体(1H12)を2 μ g/mlの濃度で50 μ l添加し、4°Cで1時間静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで10倍希釈したIsotypic control IgG1-FITC(Immunotech)を使用した。洗浄を3回行い、FCM用チューブに移し、PBSで1mlにしたサンプルをフローサイトメーターで測定した。結果を図10に示す。

その結果、BDCA3陽性細胞のほとんどがHIDE1陽性であることが分かった(図10b)

破線内)。この結果から、HIDE1は単球マーカーであるとともに、骨髓系樹状細胞のマーカーであることが示された。またこのことは同時に、HIDE1に対する抗体を使えば、末梢血から単球と骨髓系樹状細胞を同時に回収できる可能性を示唆している。

[0084] 9. 抗マウスHIDE1抗体の取得

マウスHIDE1遺伝子を培養細胞DC2.4のcDNAライブラリーからPCR法によって増幅し、得られたPCR産物を動物培養細胞発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) にクローニングした (pcDNA-mHIDE1)。なお、マウスHIDE1 (mHIDE1) のC末側にMycタグが融合されるようにベクターがデザインされている。pcDNA-mHIDE1をリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いてマウス培養細胞L-cellに一過性に導入し、その結果得られたmHIDE1発現細胞を抗原として、Wisterラットに免疫した。免疫されたラットのリンパ節から回収したリンパ球を、ミエローマP3U1と細胞融合させ、10日後に各クローンの細胞上清をサンプリングした。フローサイトメトリによりmHIDE1発現株と反応する細胞上清を選択し、抗mHIDE1抗体を產生するハイブリドーマを得た。フローサイトメトリに関しては以下にその詳細を述べる。

[0085] 10. フローサイトメトリ(FCM)

mHIDE1発現293Tと野生型293Tもしくは、mHIDE1発現L-cellと野生型L-cellを、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで懸濁し、それぞれ 1×10^5 cell/wellの細胞濃度で96wellフレキシブルプレート(FALCON)に撒いた。700g、4°Cで2分間遠心(TOMY Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX120)し、上清を廃棄した。ハイブリドーマ上清を $50 \mu l$ /well添加し、室温で30分静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで100倍希釈したIsotypic control IgGG1, 2a, 2b (MBL)を使用した。

抗体との反応後、各ウェルに2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSを $100 \mu l$ 添加し、700g、4°Cで2分間遠心して上清を廃棄した。これをもう一度繰り返して洗浄を行った。洗浄後の細胞に、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで200倍希釈したGoat F(ab')2 Fragment Rat IgG (H+L)-PE (Immunotech) を $40 \mu l$ /wellで添加し、室温で30分間静置した。二次抗体の反応後、洗浄を3回行い、細胞を2mM EDTA、0.5%BSA入りの1ml PBSで懸濁し、フローサイトメーター (Cytomics FC500 Beckman coulter) で解析

を行った。

[0086] 11. 抗mHIDE1抗体と分化マーカーを用いたPBMCの二重染色

末梢血単核球画分(PBMC)に対する抗mHIDE1抗体の反応性を調べるため、c57BL6マウス末梢血から、Lmphyte-Mammal(CEDARLANE)を用いてPBMCを単離した。PBMCを、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで懸濁し、それぞれ 1×10^5 cell/wellの細胞濃度で96wellフレキシブルプレート(FALCON)に撒いた。700g、4°Cで2分間遠心(TOMY Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX120)し、上清を廃棄した。100倍希釈したFcレセプターブロック(CD16/32抗体)(Pharmingen)を各ウェルに $50 \mu l$ ずつ添加して室温に10分間静置した後、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで100倍希釈したPEラベルされた抗体を $50 \mu l$ ずつ添加し、1時間、4°Cで静置した。使用した抗体は、CD11b、CD11c、Isotypic control IgG2a, 2b (Pharmingen)である。

抗体との反応後、各ウェルに2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSを $100 \mu l$ 添加し、700g、4°Cで2分間遠心して上清を廃棄した。これをもう一度繰り返して洗浄を行った。洗浄後の細胞にFITCラベルしたmHIDE1精製抗体(5F8)を $2 \mu g/ml$ の濃度で $50 \mu l$ 添加し、4°Cで1時間静置した。ネガティブコントロールとして、2mM EDTA、0.5%BSA入りのPBSで100倍希釈したIsotypic control IgG2b-FITC(Pharmingen)を使用した。洗浄を3回行い、FCM用チューブに移し、PBSで1mlにしたサンプルをフローサイトメーターで測定した。結果を図11(a)、(b)、図12(a)、(b)に示す。

[0087] 12. 抗mHIDE1抗体によるマウス脾臓細胞の染色

脾臓細胞に対する抗mHIDE1抗体の反応性を調べるため、c57BL6マウスの脾臓から、脾臓細胞を単離した。以下、10. で示したPBMCと同じ操作を行った。結果を図11(c)、(d)、図12(c)、(d)に示す。

[0088] マウス末梢血(PBMC)とマウス脾臓細胞に対して、抗mHIDE1抗体(5F8)と樹状細胞マーカー(CD11c)を用いた二重染色の結果、CD11c陽性細胞の一部がHIDE1陽性であることが分かった(図12b、d破線内)。CD11cはNK細胞にも発現しているが、HIDE1はNK細胞には発現していないことを確認している(データ示さず)。

[0089] これらの結果から、マウスHIDE1は、ヒトと同様に、末梢血中に存在する単球(図11)と樹状細胞(図12)、さらには脾臓に存在する単球・樹状細胞(図12、13)にも発現し

ていることが確認された。HIDE1の分布に関してヒトとマウスで相関が取れたので、今後、HIDE1の生体内における機能分析は、マウスを使って行うことができると考えられる。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明によって、新たな単球マーカーが提供された。単球は、血液中を遊走する貧食能を持った単核食細胞系に属する細胞である。一旦分化すると、骨髄中に短期間のみ存在し、その後、循環系に入りそこに数日間存在する。その後、単球は組織及び体腔に浸潤し、マクロファージ及び樹状細胞へと分化する。炎症反応において、循環系中の単球が増加することが知られていることから、単球の検出は炎症反応の検出に役立つものと考えられる。また、臓器移植後の単球の増加は、組織または移植拒否の可能性を示すものであることから、臓器移植後の診断においても本発明の単球の検出は有用である。

[0091] HIDE1は末梢血中の単球に特異的に発現していることから、セルソーターまたはマグネット等を利用して、末梢血中からHIDE1陽性単球を回収することができる。単球は樹状細胞及びマクロファージの前駆細胞であり、樹状細胞及びマクロファージは、試験管内において単球から生成することができる。CD14陽性単球から生成した樹状細胞は免疫細胞療法に用いられている(Pickl et al., J. Immunol. (1996) 157: 2850-9; Jefford et al., Blood (2003) 102: 1753)。HIDE1をマーカーとして選択される単球も同様に免疫細胞療法に利用できると考えられる。また、一方でHIDE1はリンパ球には発現していないことから、抗HIDE1抗体を用いて末梢血からHIDE1陽性細胞を除く、リンパ球を濃縮するツールとして利用することも可能である。

[0092] 活性化リンパ球を用いて腫瘍、ウイルス感染症を治療する方法が提案されている。従って、本発明のHIDE1マーカーを認識する抗体を利用することにより、癌、ウイルス感染、脊髄損傷等、単球、マクロファージ、樹状細胞及びリンパ球の投与が効果的な様々な疾患の治療及び予防において使用できる細胞を効率的に得ることができる。ヒトHIDE1は、単球の分化及び／または増殖に関与している可能性があり、さらにミエロイド系白血病にも関与しているかもしれない。HIDE1のリガンドの同定により、HIDE1の生体内における働きがより明らかになるものと期待される。

請求の範囲

[1] 以下の(1)～(3)から選択される蛋白質、またはポリペプチドに結合する単球マーカー検出用抗体。

(1) HIDE1蛋白質、

(2) HIDE1遺伝子の相補配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質、及び

(3) 上記(1)または(2)の蛋白質の断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片

[2] 次の工程を含む、単球の検出方法。

(1) 請求項1記載の抗体と、単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び

(2) 工程(1)において、抗体と結合した血液細胞を検出する工程

[3] 次の工程を含む、単球の単離方法。

(1) 請求項1記載の抗体と、単球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び

(2) 工程(1)において、抗体と結合した血液細胞を回収する工程

[4] 血液細胞試料が末梢血液、臍帯血または骨髄である、請求項2または請求項3記載の方法。

[5] 請求項1記載の抗体を含む、単球を検出及び／または単離するためのキット。

[6] 次の工程を含む、イン・ビトロにおいて単球より樹状細胞を誘導する方法。

(1) 単球細胞を樹状細胞分化誘導因子存在下で培養する工程、及び、

(2) 工程(1)で培養された細胞を請求項1記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞から樹状細胞への分化が誘導されたと判定する工程

[7] 樹状細胞分化誘導因子がGM-CSF及びIL-4である、請求項6記載の方法。

[8] 次の工程を含む、イン・ビトロにおいて単球よりマクロファージを誘導する方法。

(1) 単球細胞をマクロファージ分化誘導因子存在下で培養する工程、及び、

(2) 工程(1)で培養された細胞を請求項1記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検

出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞からマクロファージ様細胞への分化が誘導されたと判定する工程

[9] マクロファージ分化誘導因子がホルボールエステルである、請求項8記載の方法。

[10] 次の工程を含む、樹状細胞を取得する方法。

(1)採取された血液細胞試料を請求項1記載の抗体と接触させる工程、

(2)工程(1)において抗体と結合した血液細胞を回収する工程、

(3)工程(2)において回収された血液細胞を樹状細胞分化誘導因子存在下で培養する工程、

(4)工程(3)で培養された細胞を請求項1記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞が樹状細胞に分化したと判定する工程、及び

(5)工程(4)において分化したと判定された細胞を樹状細胞として単離する工程

[11] 単離された樹状細胞に抗原を取り込ませる工程をさらに含む、請求項10記載の方法

。

[12] 単離された樹状細胞が、腫瘍の予防及び／または治療に用いられるものである、請求項10記載の方法。

[13] 単離された樹状細胞に腫瘍特異的抗原を取り込ませる工程をさらに含む、請求項12記載の方法。

[14] 単離された樹状細胞が、自己免疫疾患の予防及び／若しくは治療、または臓器移植における拒絶反応の緩和に用いられるものである、請求項10記載の方法。

[15] 次の工程を含む、マクロファージを取得する方法。

(1)採取された血液細胞試料を請求項1記載の抗体と接触させる工程、

(2)工程(1)において抗体と結合した血液細胞を回収する工程、

(3)工程(2)において回収された血液細胞をマクロファージ分化誘導因子存在下で培養する工程、

(4)工程(3)で培養された細胞を請求項1記載の抗体と接触させ、HIDE1の発現を検出し、HIDE1の発現が減少した場合に、単球細胞がマクロファージ様細胞に分化したと判定する工程、及び

(5) 工程(4)において分化したと判定された細胞をマクロファージとして単離する工程

[16] 単離した細胞をさらに活性化する工程を含む、請求項15記載の方法。

[17] 単離されたマクロファージが、脊髄損傷の治療、腫瘍、感染性疾患、自己免疫疾患または免疫不全疾患の治療及び／または予防に用いられるものである、請求項15または請求項16記載の方法。

[18] 次の工程を含むリンパ球の回収方法。

(1) 請求項1記載の抗体と、リンパ球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、及び、

(2) 工程(1)において、抗体に結合されなかった血液細胞を回収する工程

[19] 次の工程を含む活性化リンパ球を取得する方法。

(1) 請求項1記載の抗体と、リンパ球を含むと考えられる血液細胞試料とを接触させる工程、

(2) 該抗体に結合されなかった血液細胞をリンパ球として回収する工程、及び

(3) 工程(2)において回収されたリンパ球を培養する工程、および

(4) 工程(3)において培養されたリンパ球を活性化し、活性化リンパ球を回収する工程

[20] 血液細胞試料が末梢血液、臍帯血または骨髄である、請求項18または請求項19記載の方法。

[21] 活性化リンパ球が、腫瘍または感染性疾患の予防及び／または治療に用いられるものである、請求項19記載の方法。

[図1]

[図2]

第1ヌクレオチド配列

ファイル名 : マウス HIDE1 (mHIDE1)
 塩基数 : 666

第2ヌクレオチド配列

ファイル名 : ヒト HIDE1 (hHIDE1)
 塩基数 : 690

[73.932% / 702 bp]

mHIDE1:1' ATGCCCTGGACCATCCTGCTGTTGCATCTGGCTCCTGGCCATCCCTGCACCATCCATC

 hHIDE1:1" ATGCCCTGGACCATCTGCTCTTGAGCTGGCTCCTGGCGATCCAGCACCATCCATC
 61' TCCTTGGTGCCTACCCAAGCAGCCACGAGGACCCATCTACATCTCGCACAGCC

 61" CGGCTGGTGCCTACCCAAGCAGCCACGAGGACCCATCCACATCGCATGGCC
 121' CCAGGGGACATCCTAGGGCCAATTTACCTGTTCCGAGGGGGAGAGGTGGTCCAGCTA

 121" CCTGGGAACCTCCGGGGCGAATTTCACACTGTATCGAGGGGGCAGGTGGTCCAGCTC
 181' CTACAGGCCCCTCAGATCGGCTGATGTAACATTCAATGTGACTGGTGGTGGCAGTGGT

 181" CTGCAGGCCCCACGGACCAGCGCGGGGTGACATTAAACCTGA---GCGCGGGCA---
 241' GGTGGCGGTGAGGCTGCTGGGGGAACTTCTGCTGTCAATATGGTGTGATGGGTGAGCAC

 233" ---GCAGCAAGGCTCCAGGGGACCCCTCACTGCCAGTGGAGTGTAGGTGAGCTC
 301' AGTCAGCCCCAGCTGTCGGACTTCAGCCAGCAGGTGCAGGTCTCCTTCCCAGTCCCCACC

 289" AACCAAGTCCCAGCTGTCAGACCTCAGCGAGCCCGTGAACGTCTCCTTCCCAGTCCCCACT
 361' TGGATCTTGGCACTCTCCCTGAGCCTGGCTGGAG--CT-GTGCTGTTCTCAGGGCTGGTG

 349" TGGATCTTGGTGCCTCCCTGAGCCTGGCTGGTGCCTCTTCCCTGGCTGGTG
 418' GCCATCACAGTGTGGTGAGAAAAGCTAAAGCCAAAACCTACAGAAGCAGAGAGAGCGT

 409" GCTGTTGCCCTGGTCAGAAAAGTTAAACTCAGAAATTACAGAAGAAAAGAGATCGA
 478' GAATCCTGCTGGGCTCAGATCAACTTCACCAATACAGACATGTCTTGATAACTCTG

 469" GAATCCTGCTGGGCCAGATTAACTCGACAGCACAGACATGTCTTGATAACTCCCTG
 538' TTTGCTATCTCCACGAAA---TGACTCAGGAAGA-----

 529" TTTACCGTCTCCCGAAAACGATGCCAGAAGAAGACCCGGCACCTGGATGATCACTCA
 570' ---CTCAGTGGCAACCCCTAG--ACTCAGGGCCTCGGAAGAGGCCACCTCTGCATCATCC

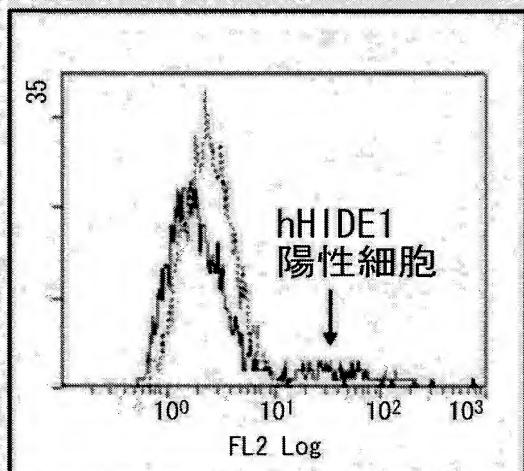
 589" GGCACCACTGCCACCCCCAGCAACTCCAGGACCCGGAAAGAGGCCACCTCCACGTCC
 625' TCTCCGGAGCCCCCTGAGTTCACTTCCGGGCTGCCAG (配列番号:1)

 649" TCGCCTGAGACCCCGAATTCACTTCCGGGCTGCCAG (配列番号:5)

[図3]

[図4]

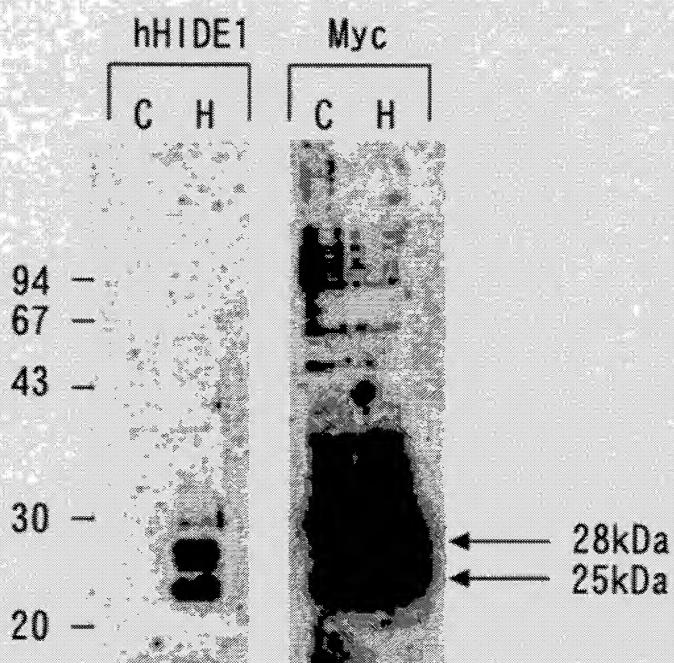
a



PE

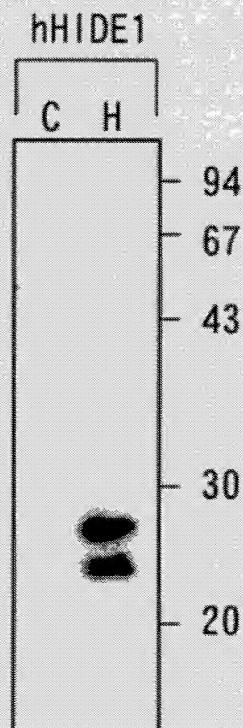
b

W. B.

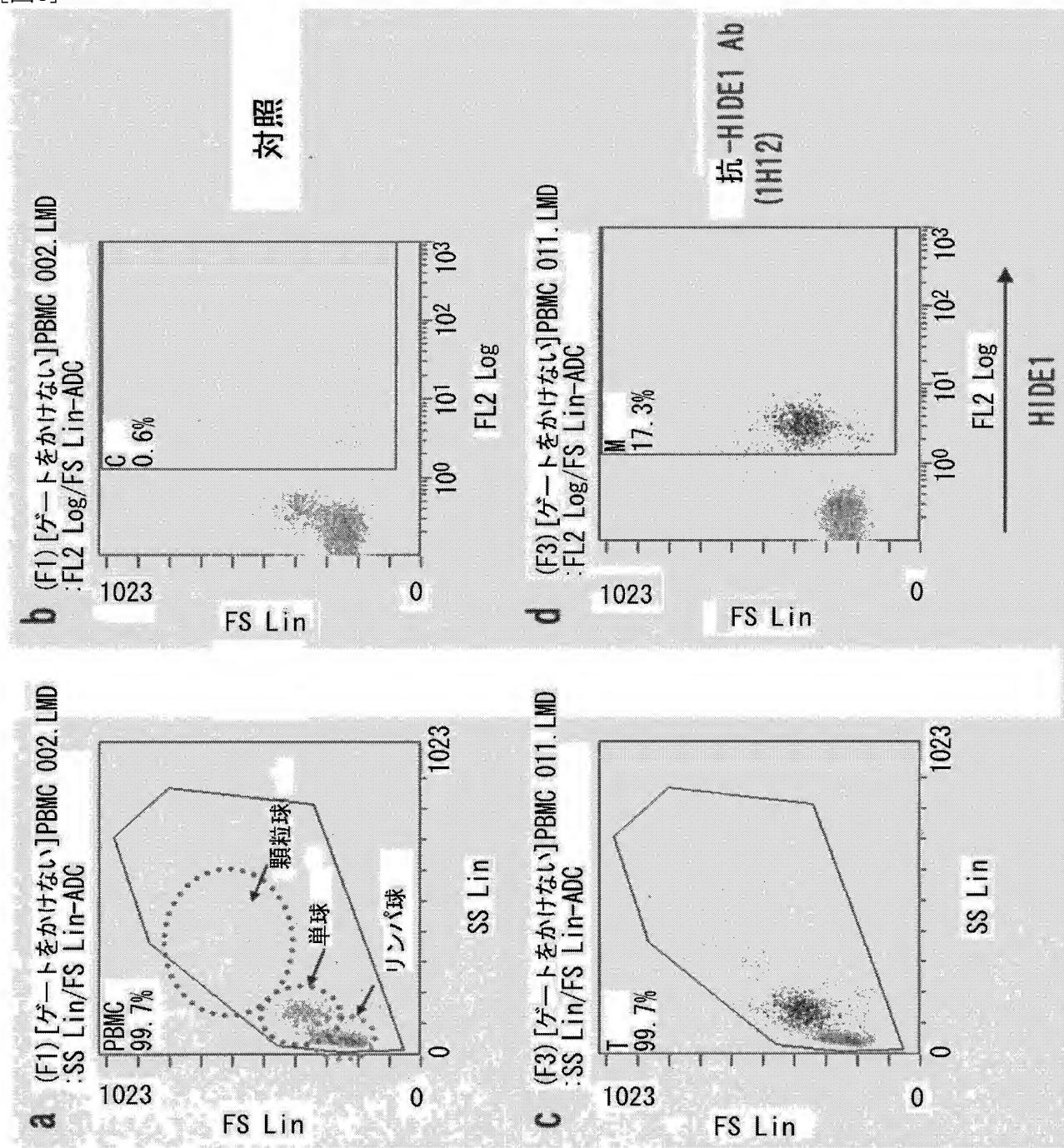


c

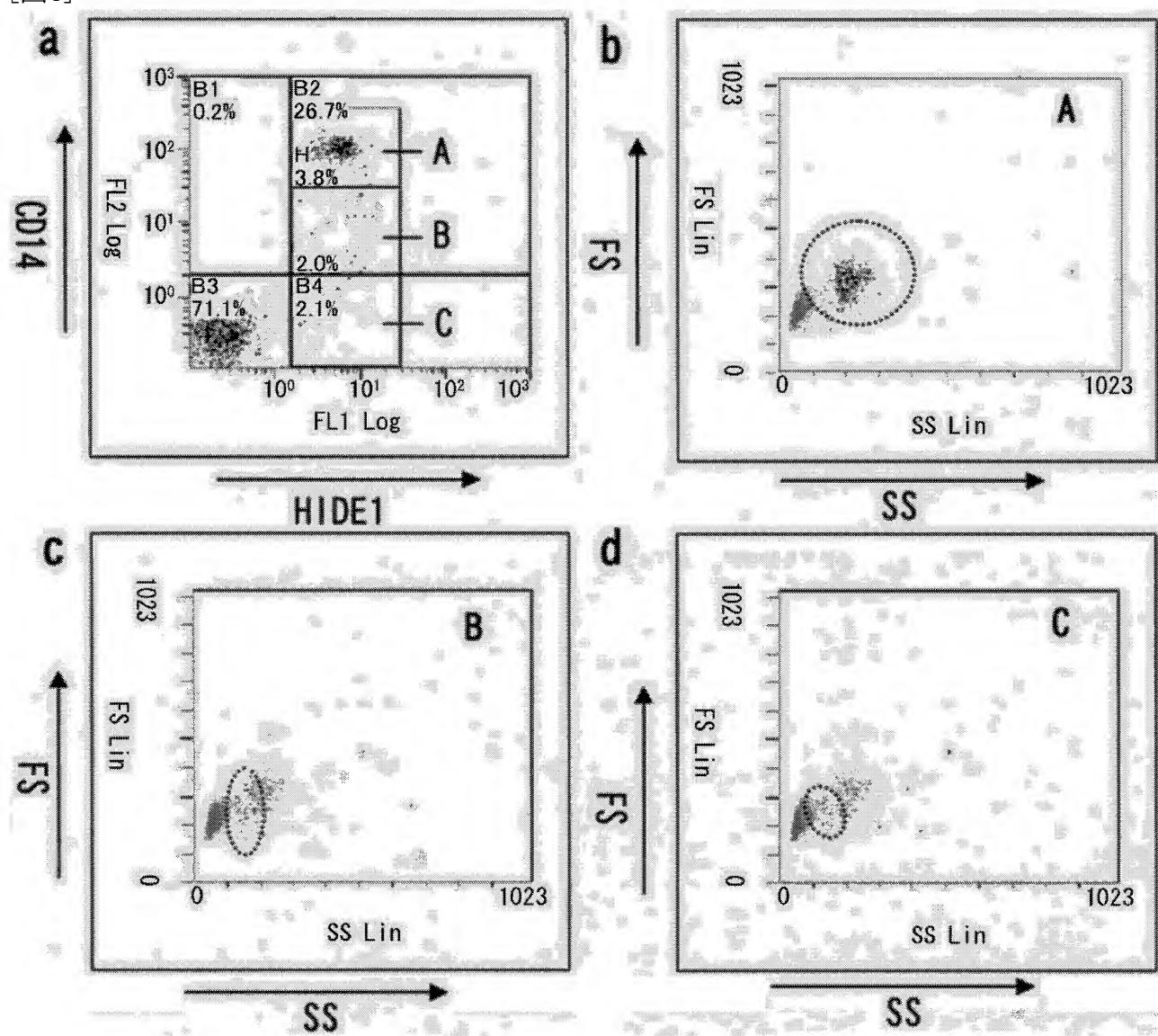
I. P.



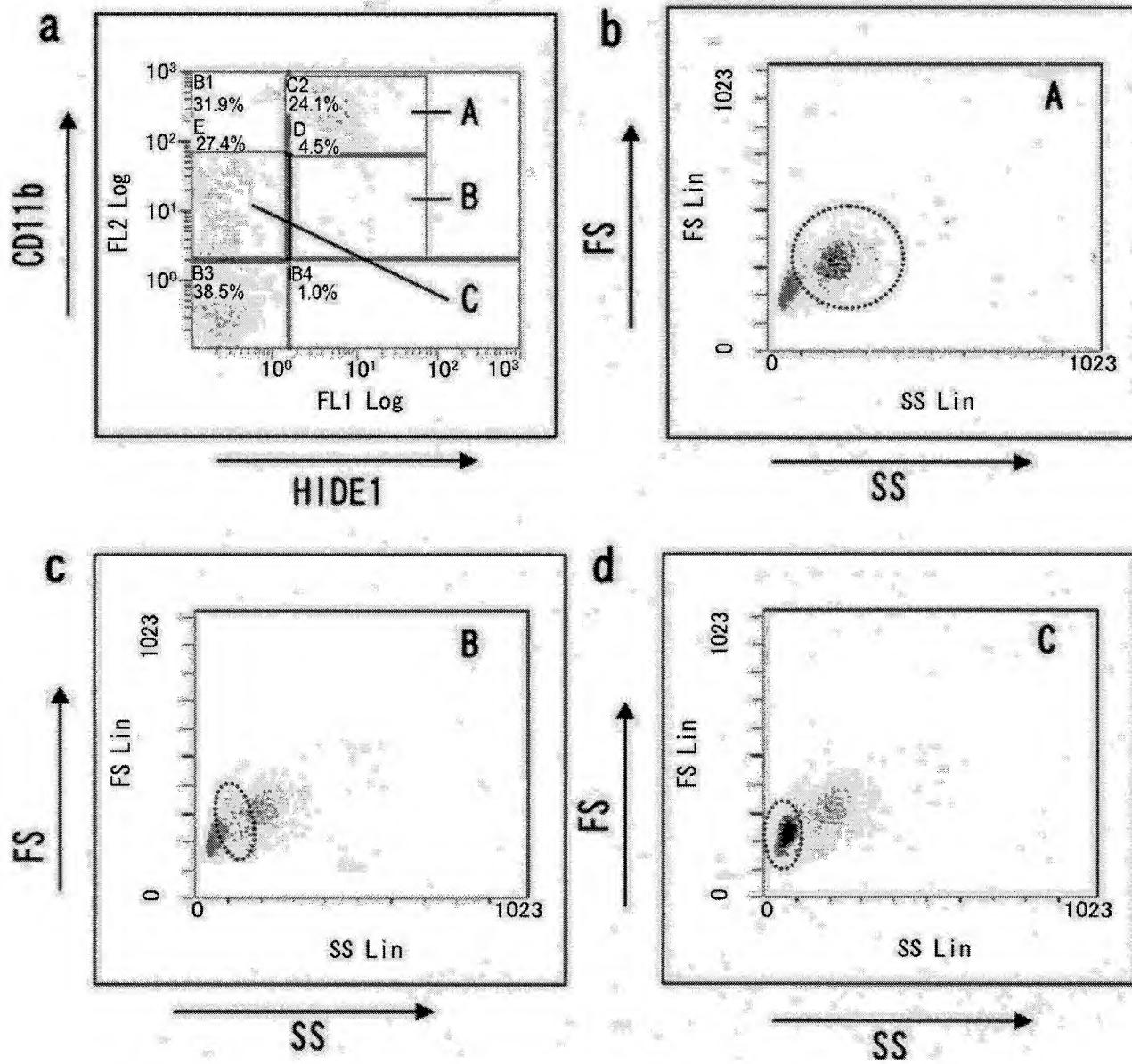
[図5]



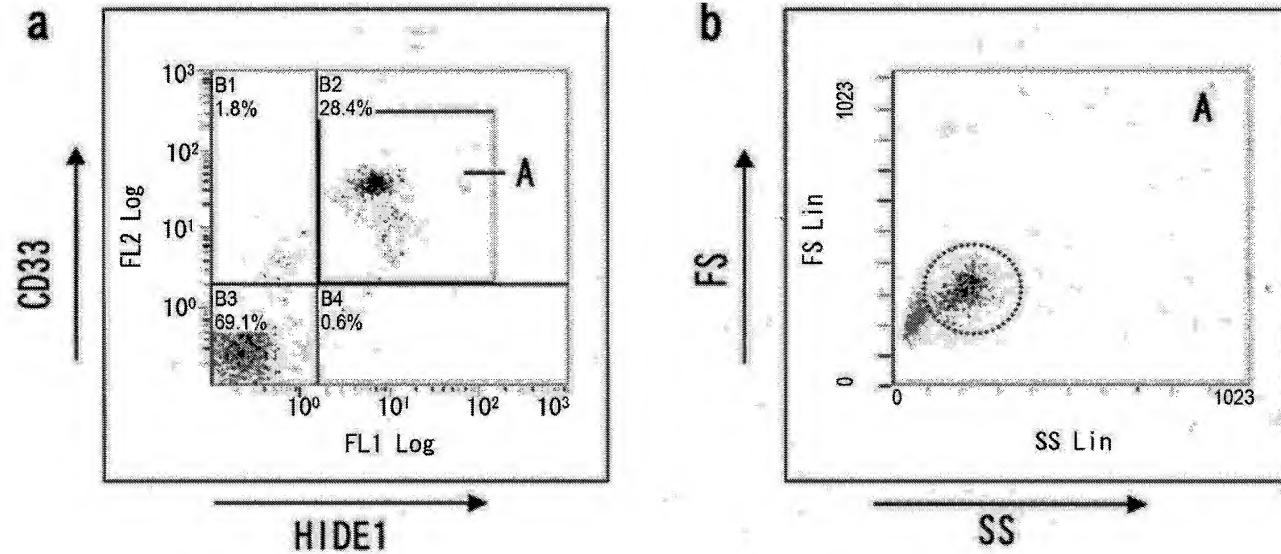
[図6]



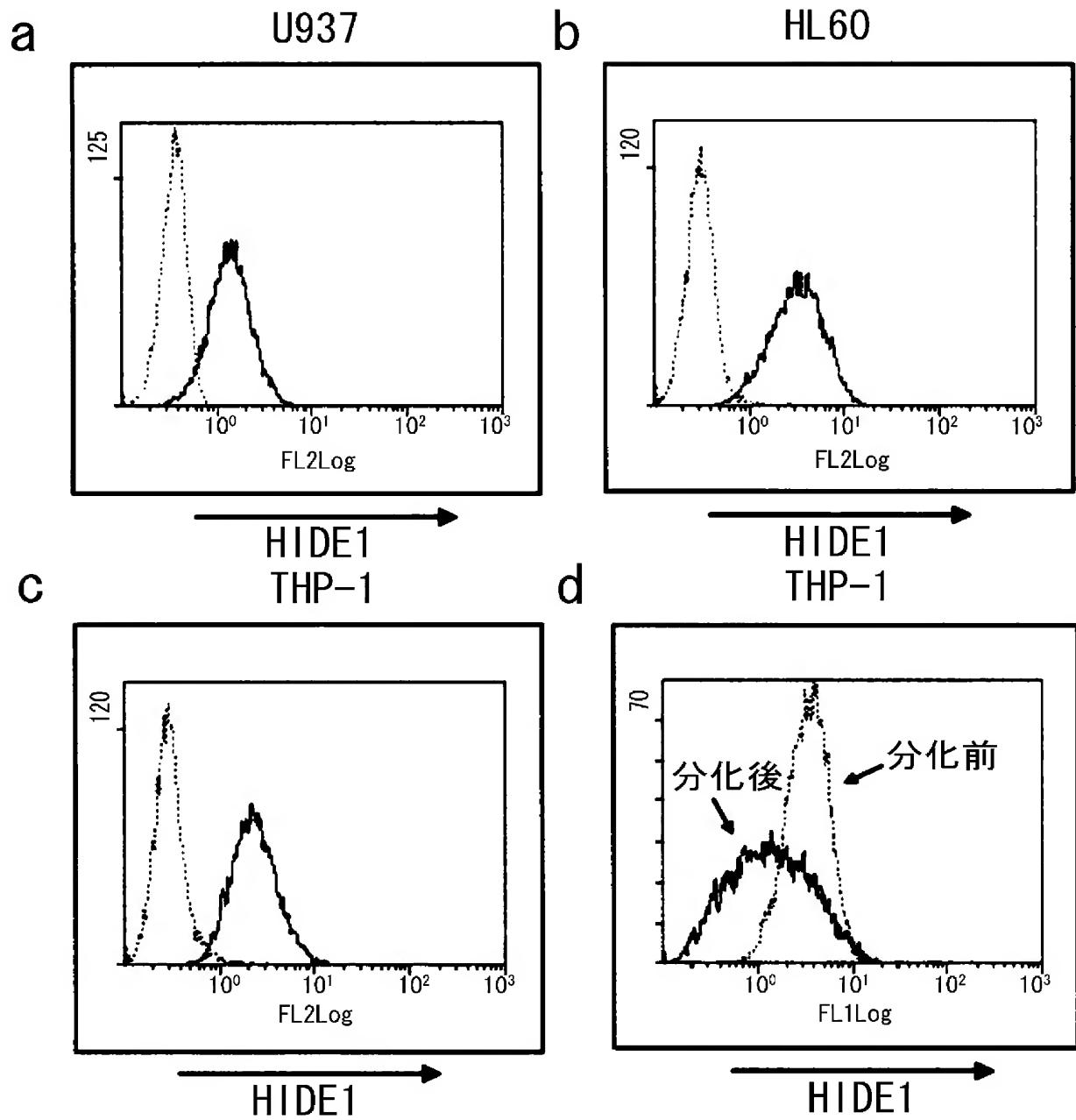
[図7]



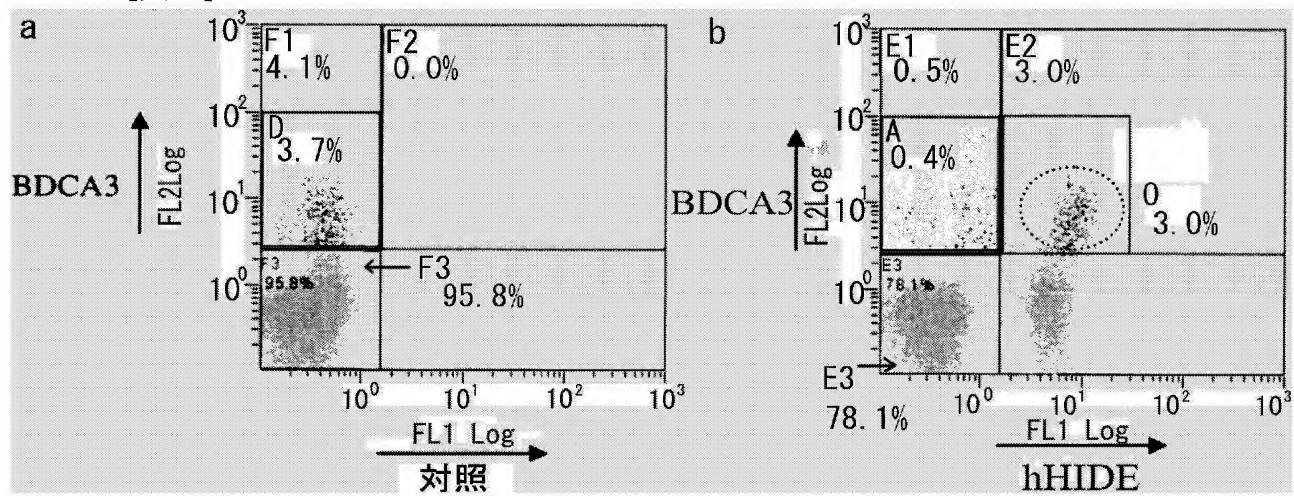
[図8]



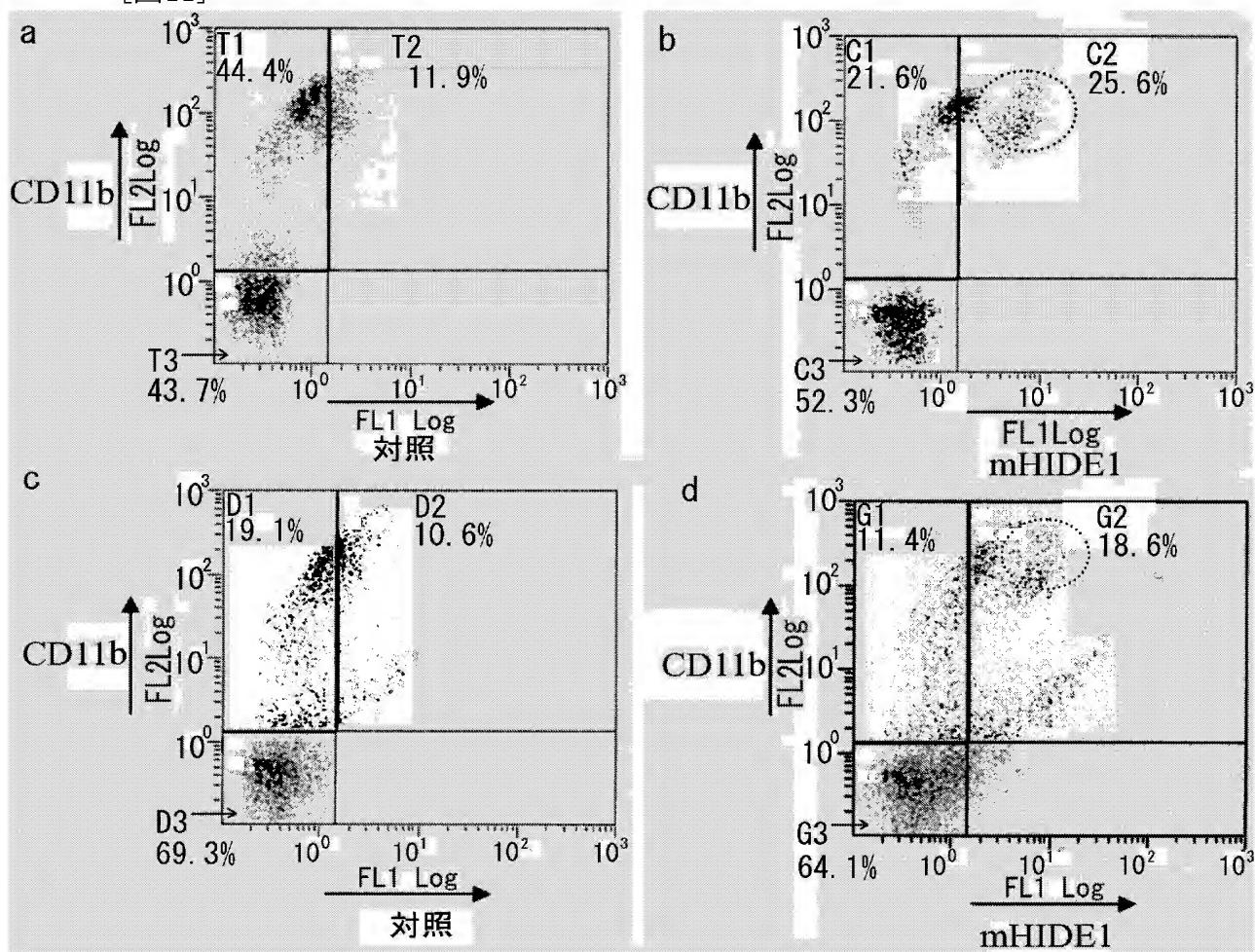
[図9]



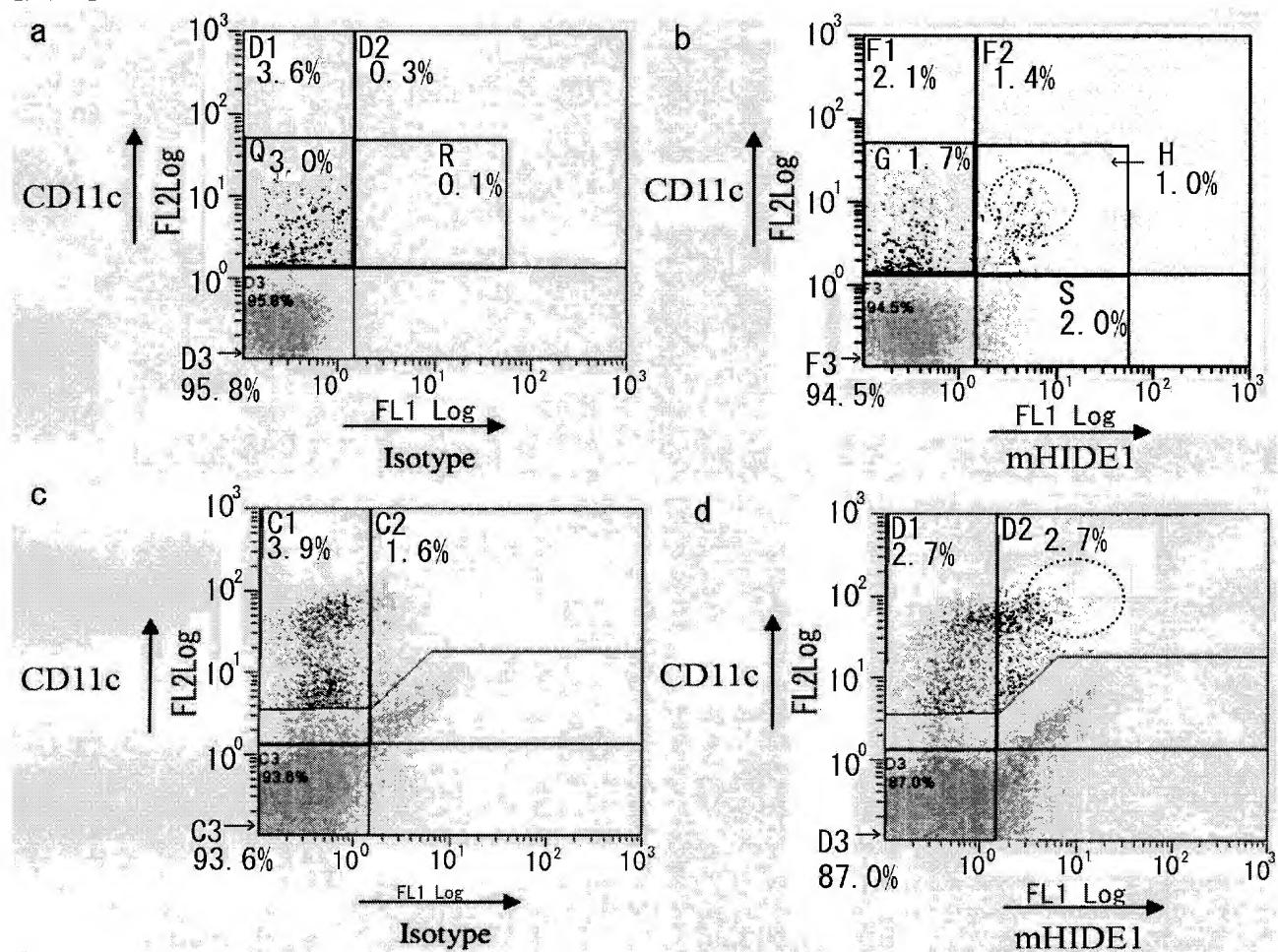
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/18, G01N33/53, C12N5/06, A61K35/14, A61K35/28,
A61K35/44, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/18, G01N33/53, C12N5/06, A61K35/14, A61K35/28,
A61K35/44, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN (MEDLINE CA BIOSIS WPIDS), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2001/09162 A2 (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 08 February, 2001 (08.02.01), Seq. Nos. 27 to 34; pages 53 to 57 & US 2002/0055139 A1 & US 2003/0027998 A1 & EP 1268506 A1 & AU 6394400 A	1 2-21
X A	WO 2001/55335 A2 (HYSEQ, INC.), 02 August, 2001 (02.08.01), Seq. Nos. 36, 37, 39, 40; pages 118 to 134 & EP 001261735 A & WO 2002/066600 A2 & AU 003300301 A & CA 002398351 A	1 2-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
31 March, 2005 (31.03.05)

Date of mailing of the international search report
19 April, 2005 (19.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X E,A	"Mus musculus shidel mRNA for SHIDE1, complete cds.", Database Genbank Accession No. AB124612, 02 March, 2004 (02.03.04), [retrieved on 29 March, 2005 (29.03.05)]	1 2-21
P,X E,A	"Mus musculus shidel mRNA for HIDE1, complete cds.", Database Genbank Accession No. AB124611, 02 March, 2004 (02.03.04), [retrieved on 29 March, 2005 (29.03.05)]	1 2-21
E,X E,A	WO 2004/080148 A2 (NUVELO, INC.), 23 September, 2004 (23.09.04), Seq.762 (Family: none)	1 2-21

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 C07K 16/18, G01N 33/53, C12N 5/06, A61K 35/14, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 31/00, A61P 35/00, A61P 37/04,

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 C07K 16/18, G01N 33/53, C12N 5/06, A61K 35/14, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 31/00, A61P 35/00, A61P 37/04,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

STN (MEDLINE CA BIOSIS WPIDS)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2001/09162 A2 (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 08. 02. 2001, SEQ27-34, 及びpp. 53-57参照	1
A	& US 2002/0055139 A1 & US 2003/0027998 A1 & EP1268506 A1 & AU 6394400 A	2-21
X	WO 2001/55335 A2 (HYSEQ, INC.) 02. 08. 2001, SEQ36, 37, 39, 40, 及びpp. 118-134参照	1
A	& EP 001261735 A & WO 2002/066600 A2 & AU 003300301 A & CA 002398351 A	2-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.03.2005

国際調査報告の発送日

19.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

新留 豊

4B

3435

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
PX	"Mus musculus shide1 mRNA for SHIDE1, complete cds.", Database Genbank Accession No. AB124612, 02.03.2004 [retrieved on 2005-03-29]	1
PA		2-21
PX	"Mus musculus shide1 mRNA for HIDE1, complete cds.", Database Genbank Accession No. AB124611, 02.03.2004 [retrieved on 2005-03-29]	1
PA		2-21
EX	WO 2004/080148 A2 (NUVELO, INC.) 23.09.2004, SEQ762参照(ファミリーなし)	1
EA		2-21